

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vývoj a validace analytické metody pro stanovení
vybraných frakcí ropných uhlovodíků v zeminách**

Diplomová práce

Kristýna Mihalová

Ochrana a využívání přírodních zdrojů

Ing. Jan Táborský, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj a validace analytické metody pro stanovení vybraných frakcí ropných uhlovodíků v zeminách " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janovi Táborskému, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a Ing. Marii Suchanové, Ph.D. za poskytnutí cenných rad a ochotnou asistenci během zpracovávání praktické části. Velký vděk bych také ráda vyjádřila firmě ALS Czech Republic, za umožnění zpracování diplomové práce.

Vývoj a validace analytické metody pro stanovení vybraných frakcí ropných uhlovodíků v zeminách

Souhrn

Ropné uhlovodíky jsou jedním z nejčastějších kontaminantů zemského povrchu i vod po celém světě. Jedná se o jeden z hlavních ekologických problémů, jelikož půdy kontaminované ropnými uhlovodíky představují riziko pro životní prostředí, přírodní zdroje i lidské zdraví. Nejčastěji sledovaným parametrem u půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky bývá parametr celkové množství ropných uhlovodíků označovaný jako TPH (z anglického “Total petroleum hydrocarbons”). Tento parametr sleduje celkové množství ropných uhlovodíků C10-C40 v půdě a jeho maximální povolené hodnoty jsou uvedeny také v metodických pokynech Ministerstva životního prostředí České republiky.

V teoretické části diplomové práce byly zpracovány informace shrnující problematiku znečištění půd ropnými uhlovodíky, toxicitu ropných uhlovodíků a jejich negativní vliv na životní prostředí i lidské zdraví. Dále byly popsány normy a metody zabývající se stanovením ropných uhlovodíků a také analytické techniky využívané pro jejich stanovení. Cílem experimentální části diplomové práce byl vývoj a validace analytické metody pro stanovení ropných uhlovodíků v zeminách (celkových extrahovatelných semi-volatilních, alifatických a aromatických frakcí ropných uhlovodíků) a separace této velké skupiny látek na blíže specifikované frakce. Vzhledem k tomu, že v mnoha zemích jsou v legislativě kromě parametru TPH sledovány i maximální koncentrace specifických uhlovodíkových frakcí aromatických i alifatických uhlovodíků (např. Polsko, Švédsko, Turecko), analýza metodou představenou v diplomové práci může sloužit pro ověření těchto limitů. Výsledná analytická metoda může být také vhodným nástrojem pro screening kontaminovaného místa, protože kromě parametru TPH poskytuje i podrobnější informace o kontaminaci včetně koncentrací aromatických sloučenin či volatilních uhlovodíků s bodem varu <170 °C.

Analytická metoda byla validována v laboratoři ALS Czech Republic, na Organickém oddělení spadající pod divizi Životní prostředí. V rámci validace metody byly ověřeny základní validační charakteristiky a u všech ověřovaných validačních parametrů bylo dosaženo velmi dobrých výsledků. Experimentální část práce byla zaměřena především na optimalizaci dělicího kroku, při kterém dochází k separaci aromatických a alifatických uhlovodíků. Byly otestovány různé kolonky pro extrakci tuhou fází včetně několika komerčně dostupných možností. U kolonky, která byla zvolena jako nejvhodnější, byl stanoven eluční profil alifatických a aromatických uhlovodíků. Dále byl kladen důraz na měřicí metodu pro GC-FID, u které byly optimalizovány především podmínky nástřiku. Výsledná analytická metoda je vhodná pro rutinní stanovení alifatických a aromatických uhlovodíkových frakcí s retenčním časem >C5-C40 v zeminách. Jedná se o rychlou a ekonomickou metodu, poskytující vysoké množství informací u zemin kontaminovaných ropnými uhlovodíky.

Klíčová slova: ropné uhlovodíky; alifatické uhlovodíky; aromatické uhlovodíky, GC-FID; analytická metoda, *n*-alkany

Development and validation of an analytical method for the determination of selected fractions of petroleum hydrocarbons in soils

Summary

Petroleum hydrocarbons are one of the most common contaminants of the earth's surface and water worldwide. This represents one of the main environmental problems, as soils contaminated with petroleum hydrocarbons pose a risk to the environment, natural resources, and human health. The most frequently monitored parameter for soils contaminated with petroleum hydrocarbons is the parameter of the total petroleum hydrocarbons, referred to as TPH. This parameter monitors the total amount of petroleum hydrocarbons C10-C40 in soil, and its maximum permitted values are also given in the methodological guidelines of the Ministry of the Environment of the Czech Republic.

The theoretical part of the diploma thesis processed information summarizing the issue of soil pollution by petroleum hydrocarbons, the toxicity of petroleum hydrocarbons and their negative impact on the environment and human health. Furthermore, standards and methods engaged in assessment of petroleum hydrocarbons as well as analytical techniques used for their determination were described. The aim of experimental part of the diploma thesis was to develop and validate an analytical method for the determination of petroleum hydrocarbons in soils (total extractable semi-volatile, aliphatic and aromatic fractions of petroleum hydrocarbons) and the separation of this large group of substances into more specified fractions. Given the fact that in many countries in addition to TPH parameter, the legislation also monitors the maximum concentrations of specific hydrocarbon fractions of aromatic and aliphatic hydrocarbons (eg Poland, Sweden, Turkey), analysis by the method presented in the thesis can be used to verify these limits. The resulting analytical method may also be a suitable tool for screening of a contaminated site, as in addition to the TPH parameter, it also provides more detailed information about contamination, including concentrations of aromatic compounds or volatile hydrocarbons with a boiling point $<170^{\circ}\text{C}$.

The analytical method was validated in the laboratory of ALS Czech Republic, in the Organic Department under the Environmental Division. Within the validation of the method, the basic validation characteristics were verified, and very good results were achieved. The experimental part of the work was focused mainly on optimizing the separation step, in which the separation of aromatic and aliphatic hydrocarbons occurs. Various solid phase extraction columns were tested, including several commercially available options. The elution profile of aliphatic and aromatic hydrocarbons was determined for the most suitable column. For the measuring method for GC-FID, mainly the conditions of injection were optimized. The resulting analytical method is suitable for routine determination of aliphatic and aromatic hydrocarbon fractions with a retention time $> \text{C5-C40}$ in soils. It is a fast and economical method, providing a lot of information on soils contaminated with petroleum hydrocarbons.

Keywords: petroleum hydrocarbons, aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, GC-FID, analytical method, *n*-alkanes

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Ropa a ropné uhlovodíky	3
3.1.1 Ropa a ropné uhlovodíky	3
3.1.2 Alifatické uhlovodíky.....	3
3.1.3 Aromatické uhlovodíky	3
3.1.4 Nejčastěji využívané ropné produkty	4
3.2 Toxicita ropných uhlovodíků	5
3.2.1 Toxické účinky ropných uhlovodíků.....	5
3.2.2 Kontaminace půdy ropnými uhlovodíky.....	5
3.2.3 Toxicita ropných uhlovodíků pro rostliny	6
3.2.4 Toxicita ropných uhlovodíků pro člověka	7
3.2.5 Parametry pro určení toxicity TPH.....	8
3.3 Standardizace a normy v analytické chemii	10
3.3.1 Typy norem v České republice.....	10
3.3.2 Metody a normy zabývající se stanovením ropných uhlovodíků	11
3.3.2.1 Metodický pokyn MŽP ČR pro stanovení ropných uhlovodíků.....	11
3.3.2.2 Stanovení alifatických a aromatických frakcí těkavých ropných uhlovodíků s použitím plynové chromatografie (ČSN EN 16558-1).....	12
3.3.2.3 Kvalita půdy - Stanovení obsahu uhlovodíků C10 až C40 plynovou chromatografií (ČSN EN ISO 16703)	12
3.3.2.4 Kvalita půdy – rizikové ropné uhlovodíky (ISO/TS 16558-2).....	13
3.3.2.5 EPA metoda 418.1	13
3.3.2.6 EPA metoda 8015B	13
3.3.2.7 Metoda TNRCC 1006 - Charakterizace ropných uhlovodíků C6–C35 v enviromentálních vzorcích.....	14
3.4 Analytické techniky využívané pro stanovení ropných uhlovodíků	14
3.4.1 Plynová chromatografie.....	14
3.4.2 FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	18
3.4.3 HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	19
3.5 Extrakční metody vhodné pro vzorky zemin	19
3.6 Extrakce pevnou fází	20
3.6.1 Silikagel	21
3.7 Porovnání vybraných metod pro stanovení ropných frakcí uhlovodíků	22

3.8	Validace	22
4	Experimentální část.....	24
4.1	Laboratorní přístroje a materiál	24
4.1.1	Laboratorní sklo a materiál	24
4.1.2	Přístroje a zařízení.....	24
4.2	Chemikálie	25
4.2.1	Chemikálie.....	25
4.2.2	Technické plyny.....	25
4.3	Standardy.....	25
4.3.1	Standardy potřebné ke stanovení alifatických a aromatických frakcí ropných uhlovodíků.....	25
4.3.2	Kalibrační roztoky standardů	26
4.3.3	Pracovní roztoky standardů	27
4.4	Ověření čistoty používaných materiálů a chemikálií	28
4.5	Typy dělicích kolonek a jejich příprava	29
4.5.1	Silikagelová kolonka s 0,5 g silikagelu.....	29
4.5.1.1	Příprava a použití	29
4.5.1.2	Ověření dělicí kapacity kolonky.....	30
4.5.2	Skleněná kolonka o objemu 50 ml s fritou, 2 g silikagelu.....	31
4.5.2.1	Příprava kolonky.....	31
4.5.2.2	Stanovení elučního profilu	32
4.6	Příprava vzorků zemin	33
4.6.1	Extrakční metoda	33
4.6.2	Použití „surrogate“ standardu	33
4.6.3	Finální zpracování extraktu po dělicím kroku	33
4.7	Optimalizace měřicí GC metody	34
4.8	Vlastní stanovení, nastavení přístroje	34
4.9	Vyhodnocování naměřených záznamů	34
4.10	Validační charakteristiky	35
4.10.1	Linearita a pracovní rozsah metody	35
4.10.2	Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ)	35
4.10.3	Pravdivost, preciznost, přesnost.....	37
4.10.3.1	Odhad pomocí obohacených (fortifikovaných) vzorků	37
4.10.3.2	Odhad pomocí certifikovaného referenčního materiálu	38
4.10.4	Reprodukovatelnost metody	39
4.10.5	Rozšířená nejistota metody	39
5	Výsledky	40
5.1	Nejčastější zdroje kontaminace z přípravy	40

5.2	Kapacita silikagelové kolonky	42
5.2.1	Skleněné kolonky s 0,5 g silikagelu	42
5.2.2	Velké skleněné kolonky s 2 g silikagelu	43
5.3	Eluční profil silikagelové kolonky	43
5.4	Surrogate standard	44
5.5	Výsledná měřicí GC metoda	45
5.6	Linearita a pracovní rozsah metody	49
5.7	LOD, LOQ a limit reportování metody	50
5.8	Pravdivost, preciznost	53
5.9	Reprodukovatelnost metody	55
5.10	Nejistota metody	55
5.11	Analýza certifikovaného referenčního materiálu	56
6	Diskuze	57
6.1	Selektivita a rušivé vlivy	57
6.2	Příprava dělicí kolonky	57
6.3	Optimalizace technických parametrů dělicí kolonky	58
6.4	Komerční silikagelové kolonky	59
6.5	Zpracování vysoce kontaminovaných vzorků	61
6.6	Výsledná měřicí metoda.....	61
6.7	Kvalitativní analýza	62
6.8	Validační charakteristiky	63
6.8.1	Robustnost.....	63
6.8.2	LOD, LOQ a limit reportování	64
6.9	Analýza certifikovaného referenčního materiálu	64
6.10	Surrogate standard	64
6.11	Reprodukovatelnost	65
7	Závěr	66
8	Seznam tabulek	67
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	69
10	Literatura	70
11	Samostatné přílohy	73

1 Úvod

Ropné uhlovodíky (RU) jsou látky přirozeně se vyskytující v minerálních zdrojích jako je ropa, bitumen nebo uhlí. Tyto látky pocházejí z organických materiálů dříve žijících organismů, které byly degradovány anaerobní cestou a po miliony let vystavovány vysoké teplotě a tlaku v zemské kůře. Ropa obsahuje rozmanité množství organických látek, jedná se o tisíce různých směsí a koncentrací chemických sloučenin, z nichž většina obsahuje uhlík, vodík a menší množství kyslíku, dusíku a síry. RU můžeme dělit jako uhlovodíky s krátkým řetězcem (aromatické a parafinické uhlovodíky), naftu (*n*-parafiny, isoparafiny, nafteny a aromatické látky), petrolej a benzín (Haider et al. 2021).

RU jsou po celém světě masově využívány jako paliva. Z důvodu vysoké poptávky po ropných uhlovodících, jako po zdroji energie, dochází velice často ke kontaminaci životního prostředí. Nejčastěji dochází ke kontaminaci během průzkumu, výroby, údržby a skladování ropných uhlovodíků, výjimkou však není ani náhodné uvolňování. S vývojem moderní civilizace je spojena stále vyšší spotřeba fosilních paliv, významným zdrojem kontaminace životního prostředí jsou například použité motorové oleje využívané v automobilech a dalších dopravních prostředcích. Kontaminace životního prostředí ropnými uhlovodíky je proto jedním ze závažných problémů této doby a má katastrofické dopady nejen na lidi, ale také další biotické složky ekosystému. Půda tvoří základní složku životního prostředí a její kontaminace ropnými uhlovodíky se řadí mezi nejrozšířenější a nejvíce škodlivé typy znečištění. Kontaminované půdy způsobují znečištění podzemních vod organickými látkami, což má za následek environmentální problémy a ekonomické ztráty jako například snížení zemědělské produktivity půdy (Fowzia & Fakhruddin 2018).

Dle pokynů Ministerstva životního prostředí ČR (1996) je při řešení problematiky míst kontaminovaných ropnými látkami nutno stanovit parametr „Uhlovodíky C10 – C40“ pomocí plynové chromatografie. Očekává-li se také znečištění nízko-vroucími frakcemi ropných uhlovodíků, jako je tomu například u petroleje nebo benzínu, je nutné provést zároveň doplňující stanovení aromatických uhlovodíků, tzv. BTEX (benzen, toluen, ethylbenzen, xylen). Toto stanovení se většinou provádí zvlášť a vyžaduje separátní postup pro přípravu analyzovaných vzorků. Pomocí nově optimalizované metody vypracované v rámci této diplomové práce, je možné toto stanovení provést jednou přípravou vzorku, pouze s finálním rozdělením vybraných frakcí pomocí SPE kolonek. To má význam nejen ekonomický, ale také environmentální, kdy dochází k menší spotřebě chemikálií a standardů potřebných k analýzám těchto parametrů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato práce je věnována vývoji, optimalizaci a validaci analytické metody pro stanovení ropných uhlovodíků v zeminách a separaci této velké skupiny látek na blíže specifikované frakce.

Cíle této diplomové práce jsou:

- Rešerše na téma ropných uhlovodíků, jejich vlastností, nejčastějších způsobů analytického stanovení v zeminách a legislativy zabývající se pokyny při stanovování těchto látek při sanacích kontaminovaných míst;
- Ověření extrakční metody používané pro stanovení celkových ropných uhlovodíků a optimalizace postupu předcházející rozdělení na aromatickou a alifatickou frakci;
- Vývoj a optimalizace dělicího kroku s použitím techniky SPE, který následuje po kroku extrakce a umožní efektivní a spolehlivé rozdělení alifatické a aromatické frakce;
- Optimalizace instrumentální metody pro GC-FID, která umožní rychlé stanovení alifatických i aromatických frakcí;
- Stanovení základních validačních charakteristik metody, jako je limit kvantifikace, rozsah metody, přesnost, pravdivost, reprodukovatelnost a nejistota měření;
- Příprava a vyhodnocení série pokusů na certifikovaném referenčním materiálu.

Hypotéza:

Nově vyvinutá analytická metoda bude vhodná pro stanovení celkového množství ropných uhlovodíků v zeminách s podrobnou výstupní informací o zastoupení jednotlivých uhlovodíkových frakcí v analyzovaném vzorku.

3 Literární rešerše

3.1 Ropa a ropné uhlovodíky

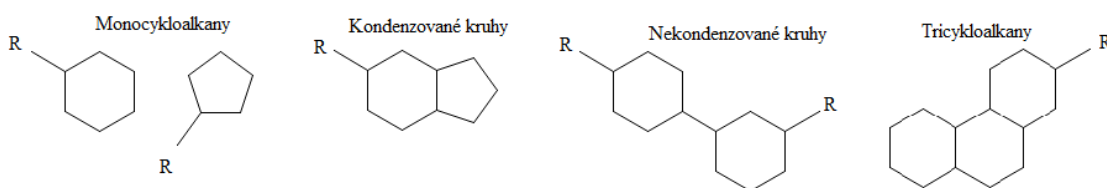
3.1.1 Ropa a ropné uhlovodíky

Ropa je olejovitá kapalina s hustotou většinou mezi 800–990 kg/m³. Skládá se plyných, pevných i kapalných látek. Převážnou část ropy tvoří uhlovodíky. Uhlovodíky jsou organické sloučeniny skládající se pouze z uhlíku a vodíku. Ropné uhlovodíky se dělí na alkany, cykloalkany a aromatické uhlovodíky. Dále pak ropa obsahuje sloučeniny síry, kyslíku a dusíku a v malém množství organické a anorganické soli obsahující kovy. Ropa obvykle obsahuje 84–87 % hm. uhlíku, 11–14 % hm. vodíku, 0,1–4 % hm. síry, 0,01–0,1 % hm. Dusíku a 0,05–1,0 % hm. kyslíku. Kromě těchto prvků obsahuje ropa také organicky vázané kovy, především vanad a nikl. Mezi ropné látky patří kromě ropy také produkty jejího zpracování jako benzín, motorová nafta, petrolej a minerální oleje (Blažek & Rábl 2006).

3.1.2 Alifatické uhlovodíky

Skupinu alifatických uhlovodíků tvoří několik samostatných skupin a to alkeny, alkany, iso-alkany a cykloalkany.

- Alkeny (olefinické uhlovodíky) se v ropě vyskytují jen zřídka, jedná se však o produkty katalytického a termického štěpení vysokovroucích ropných frakcí. Alkeny mohou být rozvětvené nebo nerozvětvené a mají vždy jednu nebo více dvojných vazeb.
- Alkany (parafinické uhlovodíky) jsou látky acyklické a nasycené, pokud mají rozvětvený řetězec, jedná se o iso-alkany. Alkany bez rozvětveného řetězce se nazývají *n*-alkany. S rostoucí teplotou varu ropné frakce obvykle jejich obsah klesá.
- Cykloalkany jsou uhlovodíky cyklické, s jedním nebo více cykloalkanickými kruhy. Cykloalkanový kruh je nejčastěji pětičlenný či šestičlenný (Blažek & Rábl 2006).



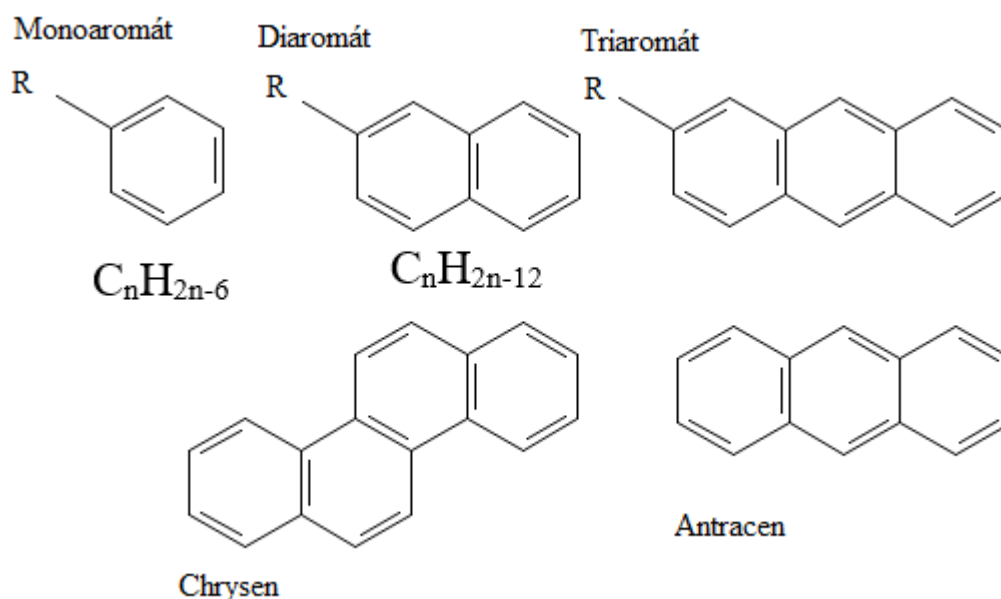
Obrázek 1: Vybrané typy cykloalkanů vyskytujících se v ropě a ropných frakcích. (R = alkylsubstituent, např. -CH₃, -C₂H₅)

3.1.3 Aromatické uhlovodíky

Aromatické uhlovodíky jsou sloučeniny obsahující jeden nebo více aromatických kruhů. Molekuly obsahující jedno aromatické jádro se řadí do skupiny monoaromátů, se dvěma aromatickými kruhy se jedná o diaromáty, dále pak triaromáty a další. Množství rozdílných typů aromatických uhlovodíků se zvyšuje s vyšším počtem kruhů v molekule, které mohou být

kondenzovány jak v přímé linii, jako je tomu například u antracenu, nebo v různých úhlech, viz chrysen (Blažek & Rábl 2006).

Polycyklické aromatické uhlovodíky – PAU přirozeně vznikají spalováním organické hmoty. Podle zdroje vzniku se dělí na PAU pyrogenního a petrogenního původu. Identifikace původu obvykle probíhá pomocí molekulárních poměrů a indexů některých konkrétních polycyklických aromatických uhlovodíků. Obecně platí, že některé dvou až tříkruhové a také alkylem substituované PAU značí petrogenní původ kontaminace neboli kontaminace pocházející z ropy a ropných produktů. Čtyř až šestikruhové PAU, indikují pyrogenní kontaminaci spalováním, tyto látky jsou více toxické a termodynamicky stabilnější než PAU z petrogenních zdrojů (Adeniji et al. 2018).



Obrázek 2: Vybrané typy aromatických uhlovodíků vyskytujících se v ropě a ropných frakcích. (R = alkylsubstituent, např. $-CH_3$, $-C_2H_5$)

3.1.4 Nejčastěji využívané ropné produkty

Nafta je střední destilát surové ropy získaný frakční destilací. Mezi další střední destiláty patří petrolej a letecké palivo. Nafta obsahuje především ropné uhlovodíky v rozmezí C11–C25 a její destilační rozsah je mezi 180–380 °C. Nafta obsahuje přibližně 64 % alifatických uhlovodíků, 1–2 % olefinických uhlovodíků a 34 % aromatických uhlovodíků.

Benzín je obecný název pro skupinu těkavých hořlavých ropných paliv používaných především ve vnitřních spalovacích motorech k pohonu automobilů a jiných vozidel. V benzínu je obsah aromátů přibližně 50 % z celkového množství uhlovodíků. Dále je v benzínu kolem 35 % isoalkanů a zbytek tvoří alkeny a cykloalkany. Destilační rozmezí benzínu je 30–200 °C. Převážná většina uhlovodíků v benzínu se nachází v rozmezí C4–C12. Benzín je nerozpustný ve vodě, rychle se odpařuje a se vzduchem tvoří výbušné směsi.

Těžký olej je přirozeně se vyskytující materiál, který obsahuje uhlovodíky syntetizované žijícími organismy. Většinou tvoří méně než 20 % z hmotnosti ropy. Jedná se o zbytek

po destilaci ropy a obsahuje přibližně 88 % uhlíku, 10 % vodíku a 1 % síry. Někdy může obsah síry v těžkých olejích dosahovat hodnoty až 5 %. Těžké oleje jsou mutagenní a nepodléhají snadno biodegradaci.

Petrolej je kapalná směs chemických látek produkovaných destilací ropy. Petrolej je hlavní složkou tryskových leteckých paliv – více než 60 %. Petrolej může být použit také jako čisticí prostředek, nebo jako rozpouštědlo. Obsahuje ropné uhlovodíky C11–C12. Petrolej je hořlavý a nerozpustný ve vodě (Fowzia & Fakhruddin 2018).

3.2 Toxicita ropných uhlovodíků

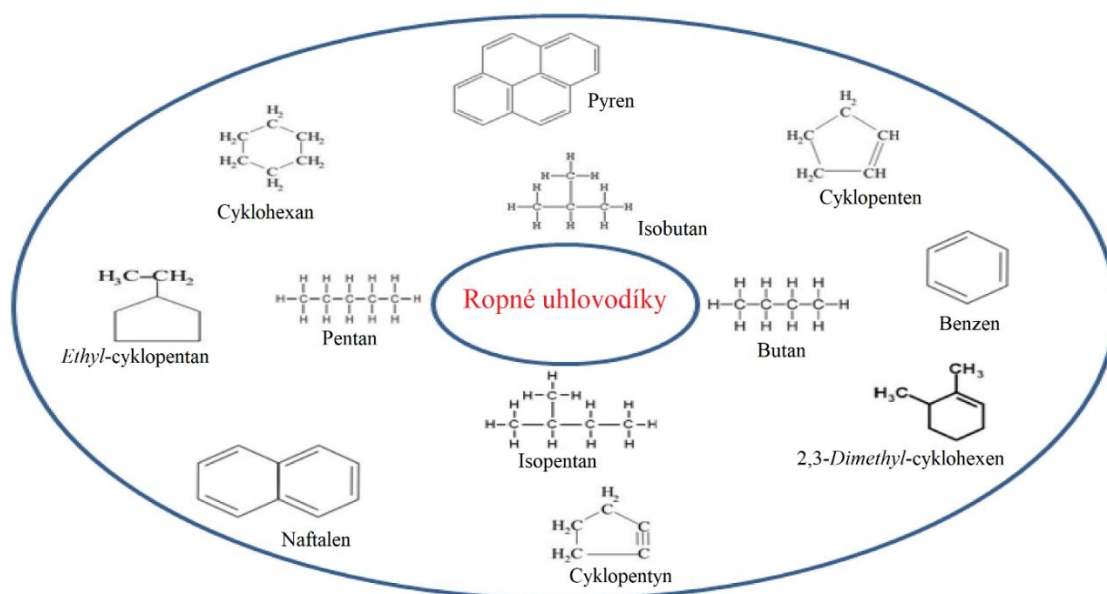
3.2.1 Toxické účinky ropných uhlovodíků

Sloučeniny ropných uhlovodíků se vyznačují širokým rozsahem relativní molekulové hmotnosti a teplotami varu. Toxické účinky ropných sloučenin v půdě a biologická dostupnost pro mikroorganismy závisí do značné míry na jejich chemickém složení a fyzikálním stavu půdy. Ropné uhlovodíky jsou obvykle toxické a mohou vykazovat letální účinky pro žijící organismy v závislosti na chemické povaze, složení a vlastnostech obsažených frakcí, způsobu, množství a době expozice. Kontaminující látky mohou lidem a zvířatům způsobit různé toxikologické zdravotní problémy, včetně hemotoxicity (destrukce červených krvinek), karcinogenity (schopnost nebo sklon vyvolat rakovinu), genotoxicity (schopnost vyvolat nepřenosné poškození DNA), mutagenity (schopnost vyvolat genetickou mutaci), teratogenity (indukce malformace embrya nebo plodu), cytotoxicity (schopnost poškozovat buňky), neurotoxicity (schopnost vyvolat poškození mozku a nervového systému), imunotoxicity (schopnost potlačovat imunitní systém), nefrotoxicity (schopnost vyvolat poškození ledvin), hepatotoxicity (schopnost vyvolat poškození jater), kardiotoxicity (schopnost způsobit poškození srdečních svalů) a oční toxicity (schopnost vyvolat oční poruchy). Ropné uhlovodíky mají také inhibiční růstové účinky na rostliny, protože brání nebo snižují příjem vody a minerálních solí, což způsobuje narušení rostlinných metabolických procesů vedoucí k nedostatku chlorofylu a živin, což může vést k poklesu odolnosti proti škůdcům a chorobám. Takto zasažené rostliny se vyznačují zakrnělým růstem, mají deformované kořeny, listy a květy s nekrotizací (Ossai et al. 2020).

3.2.2 Kontaminace půdy ropnými uhlovodíky

Kvalita půdy je přímo spojena s několika zásadními procesy, jako je výroba potravin, údržba endemické rozmanitosti mikro a makrofauny a cyklování minerálů. Proto jakákoliv kontaminace tohoto ekosystému může způsobit vážné škody pro faunu i floru. Existuje mnoho sloučenin, které mohou negativně ovlivňovat kvalitu půdy a mezi ně patří také ropné deriváty. Tyto kontaminanty představují riziko i pro vodní prostředí, jelikož mohou pronikat do povrchové nebo podzemní vody perkolací (Cruz et al. 2014). Dle Wang et al. (1999) došlo od počátku 60. let 20. století k úniku více než $0,68 \cdot 10^9$ kg ropy do půdy z pozemních ropovodů na území USA. V průměru bylo za celou dobu monitorování zaznamenáno 99 havárií pozemních ropovodů v USA ročně. Celosvětově se jedná o velmi závažný problém ohrožující životní prostředí, přírodní zdroje i lidské zdraví.

Mezi hlavní změny ve vlastnostech půdy kontaminované ropnými uhlovodíky patří nedostatek kyslíku, vody a základních živin jako je dusík a fosfor. Ropné uhlovodíky mají také negativní dopad na funkci půdních enzymů a mikrobiální aktivitu. Jelikož se jedná o látky vysoce hydrofobní, až 90 % ropných uhlovodíků zůstává uloženo v půdách. Vysoká hydrofobicita urychluje reakci s půdními částicemi a jejich pronikání do nižších vrstev půdy. Rostliny mohou akumulovat RU díky lipo-proteinovým membránám. Bylo prokázáno, že ropné uhlovodíky zvyšují oxidační stres rostlin, minimalizují jejich růst a způsobují deformace listů vedoucí k nekróze rostlinných buněk a tkání (Haider et al. 2021). Sorpce ropných uhlovodíků na půdní částice je závislá na množství organického uhlíku v půdě. Například naftalen, který je jednou z mnoha látek obsažených v ropě se na půdní částice váže v malé míře a rychle podléhá biodegradaci. Poločas rozpadu naftalenu v půdě může dosahovat až 80 dní, ale bývá jen několik hodin až dní v případě, že půda je kontaminována i dalšími PAU (Howard 1989).



Obrázek 3: Některé z hlavních toxických ropných uhlovodíků v rhizosféře ovlivňujících růst rostlin a zdraví půdy. Zdroj: Haider et al. 2021

3.2.3 Toxicita ropných uhlovodíků pro rostliny

Příjem ropných látek rostlinami vede k omezení transpirace a poškození buněčných membrán, jelikož rostliny reagují uzavřením průduchů (Száková & Tlustoš 2019). Kontaminace půd ropnými uhlovodíky má negativní vliv také na růst rostlin, jejich klíčivost, rychlost růstu i výnos. To, jak moc bude rostlina ovlivněna touto kontaminací závisí nejen na množství a složení ropných sloučenin v půdě, ale i na druhu dané rostliny. Pěstování rostlin na kontaminované půdě může pozitivně ovlivnit proces biodegradace, a to zejména stimulací rhizosférové mikrobiální komunity a také enzymatické aktivity. Tato schopnost – fytodegradace se významně liší u jednotlivých druhů rostlin a byly pozorovány vysoké odchylky i u jednotlivých odrůd rostlin. V půdách kontaminovaných ropou dochází ke snížení

dostupnosti vody, kyslíku a živin pro rostliny, což je považováno za jednu z hlavních příčin snižování objemu rostlinné biomasy (Xie et al. 2018). V Tabulce 1 jsou uvedeny příklady negativního vlivu nafty na různé rostliny.

Tabulka 1: Nepříznivý efekt kontaminované půdy naftou na růst a vývoj různých druhů rostlin.

Nepříznivý efekt	Rostlina
Negativní vliv na klíčení a růst sazenic	Pepřovec brazilský (<i>Schinus terebinthifolius</i>)
Inhibice klíčení a podélného růstu	Kostrava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i>)
Představuje hrozbu pro přežití a rozvoj rostlin	Vigna čínská (<i>Vigna unguiculata</i>)
Snížený výnos nadzemních částí a kořenů	Vlčí bob (<i>Lupinus arboreus</i>)
Negativní vliv na obsah makroprvků v ovsu a akumulaci většiny makroprvků v kukuřici	Oves setý (<i>Avena sativa</i>), kukuřice setá (<i>Zea mays</i>)
Snížení počtu klíčivých semen a omezení jejich vývoje	Bob obecný (<i>Vicia faba</i>), brukev řepka olejka (<i>Brassica napus</i>)
Při vyšších hladinách kontaminace byl výrazně omezen růst a klíčivost semen	Mungo fazole (<i>Vigna radiata</i>), čirok dvoubarevný (<i>Sorghum vulgare</i>), dochan klasnatý (<i>Pennisetum glaucum</i>)

Zdroj: Fowzia & Fakhrudin (2018)

3.2.4 Toxicita ropných uhlovodíků pro člověka

Největšímu riziku z expozice ropným uhlovodíkům a jejich akutní toxicitě jsou vystaveni lidé pracující v petrochemickém průmyslu. Mezi nejvíce rizikové činnosti patří vypouštění potrubí, opravy potrubí a čerpadel, ruční vypouštění a plnění nádrží, čištění filtrů v rafinériích, rutinní odběr vzorků a laboratorní manipulace s nimi. Při expozici ropnými látkami může docházet jak k akutním, tak i chronickým toxickým účinkům.

Způsoby expozice jsou: inhalace, požití, expozice očima a expozice kůží. Při dlouhodobém vystavení pokožky naftě mohou nastat některé chronické projevy toxicity jako je hyperkeratóza (ztluštění horní vrstvy kůže) nebo různé jiné kožní poruchy. Ve většině případů jsou tyto projevy způsobeny nedostatečným nebo nevhodným použitím ochranných pomůcek a prostředků.

Akutní toxické efekty ropných uhlovodíků na člověka zahrnují velkou škálu symptomů a lze je dělit dle způsobu expozice. Jako příklad jsou v Tabulce 2 uvedeny akutní toxické účinky nafty (Fowzia & Fakhrudin 2018).

Tabulka 2: Akutní toxické účinky nafty na člověka dle typu expozice.

Typ expozice	Akutní efekty
Inhalace	Bolest hlavy, nevolnost, ztráta koordinace, kašel horečka, arytmie
Požítí	Průjem, zvracení, nevolnost, podráždění trávicího traktu
Oční expozice	Pálení a bolest očí, nadměrné slzení, hyperémie spojivky (nadměrné prokrvení)
Kožní expozice	Bolest, zarudnutí, puchýře, vysušení, popraskání a podráždění kůže, v extrémních případech vznik zhoubných výrůstků
Neurotoxická	Neurologické poruchy, ospalost, snížení senzomotorické rychlosti
Nefrotoxická	Oligurie (vyučování nedostatečného množství moči), nevolnost, křeče v břiše a průjem

Zdroj: Fowzia & Fakhruddin (2018)

3.2.5 Parametry pro určení toxicity TPH

Při posuzování míry toxicity pro člověka hraje velkou roli, o jaké ropné uhlovodíky se jedná. Nejčastěji používaná hodnota TPH (celkový obsah ropných uhlovodíků) je enviromentálním ukazatelem udávající ropnou kontaminaci. Tento parametr je vhodný při stanovování kvality půdy, ale ne při stanovování toxicity. Parametr TPH neposkytuje dostatečné množství podkladů pro hodnocení rizik ropných kontaminantů pro lidské zdraví a životní prostředí. Abychom byli schopni zhodnotit ekotoxikologické a toxické účinky ropných uhlovodíků, potřebujeme mnohem detailnější informace než jen parametr TPH. Pro provedení analýzy rizik zemin by měl být zahrnut do TPH také parametr C6-C10, což často vyžaduje další analytické metody. Namísto kvantifikace TPH jako jediné hodnoty je vhodnější zvolit metodu frakcionace, kdy se bere v potaz ekvivalentní počet uhlíků jednotlivých látek.

Alifatické a aromatické frakce mají různé fyzikálně-chemické a toxikologické vlastnosti, proto musí být stanovovány samostatně. Dle většiny norem je nutné provést rozdílné analytické metody pro stanovení těžkých frakcí C5–C10 a semi-volatilních frakcí C10–C40 (Pinedo et al. 2014).

Dlouhodobě kontaminovaným místům dominují silně vázané či perzistentní frakce ropných uhlovodíků, které nejsou snadno biologicky dostupné. Lze tedy předpokládat, že ropné uhlovodíky nacházející se na dlouhodobě kontaminovaných lokalitách jsou méně toxické, protože toxicita přímo souvisí s biologickou dostupností a biodegradovatelností ropných uhlovodíků. Mnoho potenciálně toxických sloučenin ze skupiny alifatických i aromatických uhlovodíků se může uvolňovat na místech kontaminovaných TPH prostřednictvím

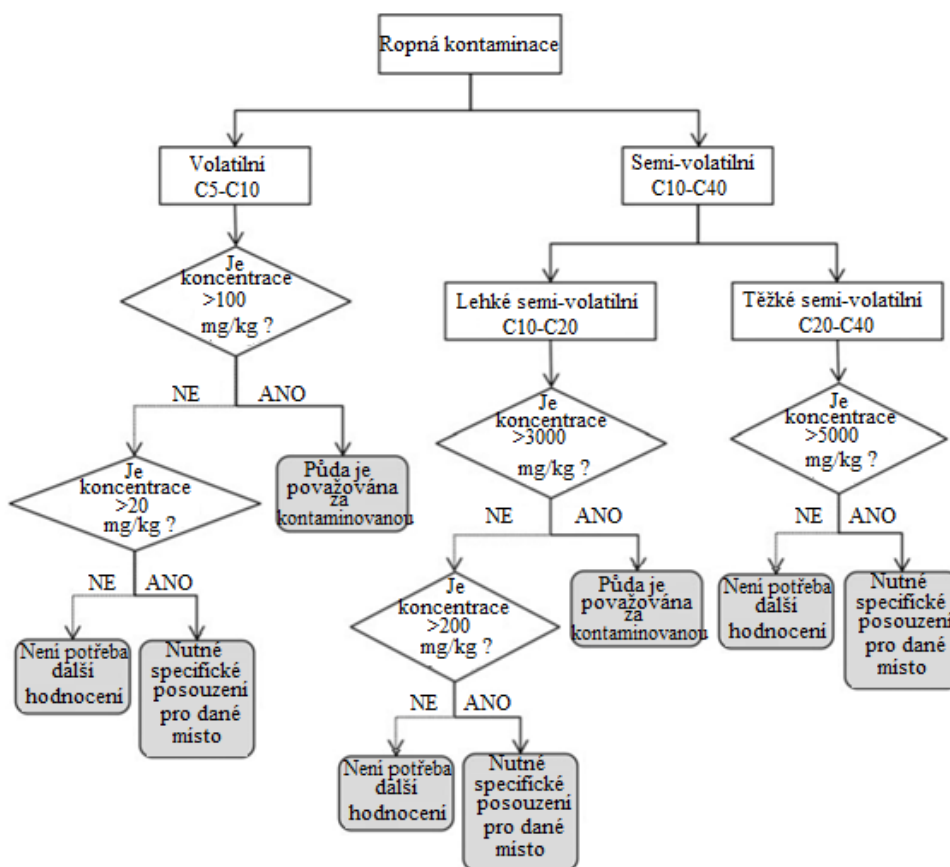
povětrnostních nebo biodegradačních procesů. Proto je otázka biologické dostupnosti ropných uhlovodíků důležitým faktorem při procesu hodnocení rizik (Khan et al. 2018).

Hodnocení rizik pro lidské zdraví (HHRA) je založeno na prediktivních nástrojích k určení a kvantifikaci potenciálních zdravotních rizik spojených s konkrétní látkou. Toto hodnocení zahrnuje pochopení povahy chemických látek, kterým může být člověk vystaven, rozsahu, času a způsobu expozice a citlivosti potenciálních receptorů. Informace jako způsob expozice nebo citlivost receptorů slouží ke kvantifikaci tyto veličiny jsou zohledněny v celkovém indexu lidského rizika jako jednotlivé rizikové kvocienty HQ. Aplikace těchto nástrojů poskytuje užitečná data pro hodnocení toxicity frakcí TPH různých ropných produktů. Pro jednotlivé frakce či látky se stanovuje index zdravotního rizika HRI. Ten uvádí, jak moc je daná látka nebezpečná pro lidské zdraví. Maximální přípustná hodnota HRI je 1,0, takže získané hodnoty jsou přímo standardizovány (Pinedo et al. 2014). Výpočet HRI je uveden v Rovnici 1.

$$HRI = \sum HQ_i$$

Rovnice 1: Index lidského rizika HRI, vyjádřen jako součet různých rizikových kvocientů pro látky nebo frakce TPH.

Na následujícím Obrázku 4 můžeme vidět příklad pro hodnocení rizik pro člověka u půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky.



Obrázek 4: Postup pro hodnocení rizik pro lokality zasažené ropnými produkty. Zdroj: Pinedo et al. 2014.

3.3 Standardizace a normy v analytické chemii

3.3.1 Typy norem v České republice

V analytické chemii se většina metod odkazuje na technické normy. Dle Úřadu pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (ÚNMZ) jsou technické normy dokumentované dohody, které pro všeobecné a opakované použití poskytují pravidla, směrnice, pokyny nebo charakteristiky činností nebo jejich výsledků, které zajišťují, aby materiály, výrobky, postupy a služby vyhovovaly danému účelu. Technické normy jsou kvalifikovaná doporučení a nejedná se o nařízení. Jejich používání je dobrovolné. V České republice máme tři hlavní typy norem, a to české normy, mezinárodní normy a normy evropské.

České technické normy se značí jako ČSN. Každá evropská či mezinárodní norma přijatá do soustavy českých norem se stává normou českou. Značí se pak předřazením zkratky ČSN před původní název normy, např. ČSN EN 14039. Původní česká technická norma může být vytvářena pouze v oblastech, ve kterých neexistují normy evropské nebo mezinárodní. Současně platí pravidlo, že se ruší překonané či konfliktní původní české technické normy převzetím nové aktuální normy. Původní české technické normy tvoří jen přibližně 5 % celkové produkce technických norem v České republice každý rok. Každý rok je vytvořeno více než 1500 ČSN norem, z toho tedy kolem 95 % tvoří převzaté normy evropské a mezinárodní. Na jejich tvorbě s prostřednictvím ÚNMZ podílejí odborníci z České republiky a jsou vydávány Českou agenturou pro standardizaci z pověření ÚNMZ (ÚNMZ, 2021).

Mezinárodní organizace pro standardizaci se značí jako ISO a Česká republika je členem této organizace. Jedná se o nezávislou nevládní mezinárodní organizaci čítající 165 členů tvořených národními normalizačními orgány. Každý člen reprezentuje ISO ve své zemi a každá země je zastoupena pouze jednou. Cílem ISO je vývoj mezinárodních standardů za pomoci členů této organizace. ISO má na starosti vedení a kontrolu tisíců dokumentů a obsahuje širokou škálu odvětví jako například standardy řízení kvality, standardy ochrany zdraví a bezpečnosti, standardy pro testování a kalibrace laboratoří a mnoho dalších (ISO, 2021).

Technická specifikace je značená TS, a jedná se o normativní dokument. Technické specifikace jsou zveřejňovány před vydáním mezinárodní normy, například když se předmět standardizace stále vyvíjí. Cílem technické specifikace je možnost okamžitého použití. Snahou je, aby byly technické specifikace nakonec transformovány a znovu publikovány jako mezinárodní standard (ISO, 2021).

Evropské normy jsou značené EN. Česká republika je členem evropského výboru pro normalizaci (CEN), který vydává evropské normy. Je proto zavázána přebírat evropské normy do národní soustavy norem ČSN a v případě konfliktů zrušit ustanovení národních norem.

Normy vydané americkou agenturou pro ochranu životního prostředí se značí US EPA. Tato agentura má primárně za úkol ochranu životního prostředí a jako ochranný orgán spolupracuje s vládou USA. Jedním z mnoha úkolů této agentury je zabezpečení sledování remediace kontaminovaných území. Proto existují normy vydané touto agenturou, které např. u míst kontaminovaných ropnými uhlovodíky udávají, jakým způsobem mají být vzorky půdy analyzovány.

3.3.2 Metody a normy zabývající se stanovením ropných uhlovodíků

3.3.2.1 Metodický pokyn MŽP ČR pro stanovení ropných uhlovodíků

Ropné látky jsou jedním z nejčastějších kontaminantů zemin a podzemních vod. Indikátor znečištění ropnými látkami je parametr C10-C40, který se stanovuje plynovou chromatografií, nejčastěji s FID detektorem. Dříve byl sledován také parametr NEL (nepolární extrahovatelné látky), který je stanovovaný pomocí infračervené spektrometrie. Metoda plynové chromatografie podává přesnější informace o charakteristickém spektru ropného znečištění. Z tohoto důvodu byla zavedena plynová chromatografie v novele č. 229/2007 Sb., kterým se mění nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, které tak sleduje celoevropský trend použití metod na stanovení ropných uhlovodíků popisujících tento typ znečištění pomocí profilu konkrétních kontaminantů.

Metoda stanovení C10-C40 pomocí plynové chromatografie je nyní jedinou akceptovatelnou metodou pro měření kontaminace RU. Parametr C10-C40 zahrnuje užší spektrum látek než parametr NEL. V souladu s metodickým pokynem Ministerstva životního prostředí České republiky je proto doporučeno kromě parametru C10-C40 sledovat také přítomnost dalších složek ropného znečištění. V případě očekávání kontaminace níže vroucími frakcemi uhlovodíků, jako je např. benzín nebo letecký petrolej, je nutno stanovovat parametry BTEX, a také MTBE (methyl-*terc*-butyl ether). Pokud předpokládáme znečištění vysoko vroucími frakcemi, jako jsou oleje, poté stanovujeme také PAU (polycyklické aromatické uhlovodíky).

Indikátory znečištění jsou uvedeny v Tabulce 3. V platných metodických pokynech MŽP jsou indikátory znečištění definovány takto: „*Indikátory znečištění jsou specifické koncentrace jednotlivých chemických látek v zemině, podzemní vodě a v půdním vzduchu. Překročení hodnot indikátorů se posuzuje jako indikace znečištění, které by mělo být dále zkoumáno a hodnoceno, a to především z hlediska rizik pro případné příjemce znečištění a ohrožené ekosystémy*“ (MŽP 2013). Jako indikátor znečištění ropnými látkami může sloužit také vytvoření volné fáze ropných látek (MŽP 1996).

Tabulka 3: Přehled maximálních povolených hodnot indikátorů znečištění zemin a podzemní vody ropnými látkami dle MŽP; Zdroj: Metodický pokyn MŽP (2013).

Látka	Zemina		Podzemní voda
	Průmyslově využívané území	Ostatní plochy	
	mg/kg sušiny		µg/l
Ropné látky (jako uhlovodíky C10–C40)	1500	500	500
Methyl- <i>terc</i> -butyl ether (MTBE)	220	43	12
Benzen	5,4	1,1	0,39
Toluen	45000	5000	860
Etylbenzen	27	5,4	1,3
Xyleny	2700	630	190

Hodnota TPH (total petroleum hydrocarbons) reprezentuje směs sloučenin a může být získána několika odlišnými analytickými metodami, z nichž některé se používají již desítky let a jiné byly vyvinuty relativně nedávno. Jako příklad lze uvést metody EPA 418.1, 8015B, 1664 a 8020B.

3.3.2.2 Stanovení alifatických a aromatických frakcí těkavých ropných uhlovodíků s použitím plynové chromatografie (ČSN EN 16558-1)

Stanovení těkavých frakcí ropných uhlovodíků v zeminách dle normy ČSN EN 16558-1 probíhá za použití plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Aromatické látky jsou zde stanovovány jako suma jednotlivých aromatických látek. Suma těkavých alifatických uhlovodíků C5–C10 a aromatických těkavých uhlovodíků C5–C10 je nazývána jako parametr „těkavé oleje“. Výsledky této analýzy jsou často využívány pro hodnocení rizik pro půdy kontaminované ropnými uhlovodíky.

3.3.2.3 Kvalita půdy - Stanovení obsahu uhlovodíků C10 až C40 plynovou chromatografií (ČSN EN ISO 16703)

V této normě je specifikováno stanovení uhlovodíků C10–C40 v zeminách pomocí plynové chromatografie. Tato norma uvádí metodiku pro stanovení uhlovodíků s bodem varu mezi 175 °C a 525 °C. Pokud není zařazen čistící krok pomocí florisilu, jsou ve výsledku zahrnuty izoalkany, cykloalkany, alkylbenzeny, alkylnaftaleny a polycyklické aromatické uhlovodíky. Čistícím krokem lze oddělit polárnější látky, jako jsou právě polycyklické aromatické uhlovodíky. Metoda není vhodná pro stanovení těkavých frakcí uhlovodíků, proto není vhodná např. pro stanovení některých pohonných hmot, které obsahují vysoký poměr uhlovodíků <C10, např. benzín. Velmi podobná norma zabývající se stanovením stejného parametru v pevných odpadech je norma „Charakterizace odpadů - Stanovení obsahu

uhlovodíků C10 až C40 plynovou chromatografií (ČSN EN 14039)“ Tato metoda je určena primárně pro odpady, ale mezi pevné odpady lze za určitých okolností zahrnout i kontaminované půdy.

3.3.2.4 Kvalita půdy – rizikové ropné uhlovodíky (ISO/TS 16558-2)

Tato norma je jedním z hlavních dokumentů, ze kterých vychází praktická část této diplomové práce. Zaobírá se stanovením alifatických a aromatických frakcí semivolatilních ropných uhlovodíků. Jako extrakční činidlo se v této metodě používá směs rozpouštědel *n*-heptanu a acetonu. Po extrakci mechanickým třepáním nebo sonifikací je organická vrstva odebrána a získaný extrakt je přečištěn s vodou, aby došlo k odstranění acetonu. Takto změřený extrakt na GC-FID nám po vyhodnocení poskytne výsledek všech extrahovatelných semivolatilních uhlovodíků v rozmezí C10–C40. Pokud je hodnota měřeného parametru C10–C40 vyšší než 100 mg/kg/DW, může se zbytek původního extraktu rozdělit pomocí silikagelové kolonky. Za pomoci správně zvolených typů a objemů elučních činidel získáváme oddělenou alifatickou a aromatickou frakci uhlovodíků. Místo *n*-heptanu lze použít jiné čisté rozpouštědlo, nebo i směs rozpouštědel, bod varu použitého extrakčního činidla by však měl být mezi 36 °C a 99 °C. Jako možné interferující látky jsou uváděny látky, které mají bod varu mezi body varů uhlovodíků C10 a C40 a mohou být také extrahovány vybraným extrakčním činidlem, např. halogenované uhlovodíky.

3.3.2.5 EPA metoda 418.1

Tato metoda poskytuje jednočíselnou hodnotu parametru TPH a neposkytuje nám žádnou informaci o složení a poměru jednotlivých látek. Měření probíhá pomocí infračervené spektroskopie. Hodnota naměřená touto metodou je závislá na schopnosti použitého extrakčního činidla extrahovat ropné uhlovodíky z daného média a také na absorpci infračerveného záření ropnými uhlovodíky v extrakčním činidle. Je třeba poznamenat, že tato metoda není specifická pro ropné uhlovodíky a nemusí vždy indikovat ropnou kontaminaci. Metoda EPA 418.1 je jednou z nejhodněji používaných metod pro stanovení ropných uhlovodíků a její název je stanovení oleje, tuku a TPH. Výhodou této metody je její relativně nízká cena a vynikající reprodukovatelnost. Mezi hlavní nevýhody patří fakt, že složení ropných uhlovodíků se mezi zdroji a v průběhu času mění, takže výsledky nemusí být vždy porovnatelné, dále pak skutečnost, že touto metodou nezískáme prakticky žádné informace o typu ropných uhlovodíků. Tato metoda je tak vhodná především pro počáteční prověřování kontaminace tzv. screening (Rauckyte et al. 2010).

3.3.2.6 EPA metoda 8015B

Další velice častou metodou pro stanovení TPH je metoda EPA 8015B, využívající plynové chromatografie s FID detektorem (plamenově-ionizační). Tato metoda plynové chromatografie, spojená se specifickými extrakčními technikami nám může poskytnout

informace o typu produktu. Z toho důvodu roste trend využití GC metod pro stanovení TPH v půdách a sedimentech. Jedním z aspektů je to, že použitím vhodných technik čištění nebo odizolování můžeme separovat a stanovovat zvlášť volatilní a semivolatilní látky. Takto oddělené parametry se často nazývají jako GRO (gasoline range organic), což je volatilní benzínová frakce a DRO (diesel range organic), neboli semivolatilní naftová frakce (Rauckyte et al. 2010).

3.3.2.7 Metoda TNRCC 1006 - Charakterizace ropných uhlovodíků C6–C35 v enviromentálních vzorcích

Tato texaská metoda je navržena k rozdělení a kvantifikaci alifatických a aromatických frakcí ve vzorcích zemin i vod. K oddělení alifatických a aromatických frakcí je zde použita kolonka s pevnou fází, kterou tvoří oxid křemičitý. Jako extrakční činidlo se používá *n*-pentan. Metoda je vhodná pro stanovení uhlovodíků v rozmezí benzínu a nafty. Také lze stanovit část těžších paliv a mazacích olejů. Metoda TNRCC 1006 se používá pouze ve spojení s metodou TNRCC 1005. Instrumentace metody je GC-FID. V experimentální části diplomové práce se při návrhu dělicích kolonek vycházelo právě z této metody.

3.4 Analytické techniky využívané pro stanovení ropných uhlovodíků

3.4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda. Jako analytický nástroj může být plynová chromatografie použita na přímou separaci a analýzu plynných látek, kapalných látek, a také pevných těkavých látek.

Princip metody je rozdělování složek mezi dvě fáze, fázi mobilní a stacionární. Mobilní fázi je v plynové chromatografii plyn, nazývaný jako nosný plyn. Stacionární fáze může být pevná látka, nebo tenká vrstva vysokovroucí kapaliny na pevném inertním nosiči. Stacionární fáze se nachází v chromatografické koloně. Každá složka dělené směsi má různou rychlost postupu kolonou v závislosti na distribuční konstantě K_D . Kolona může být kapilární nebo náplňová (Podehradská 1997). Z praktických důvodů se v dnešní době používají převážně kolony kapilární, které mají mnohem vyšší efektivitu a jsou méně náročné na údržbu. Nevýhodou je jejich vyšší cena. Kapilární kolony z inertního taveného křemene byly vyvinuty v roce 1979 a jejich zavedení mělo za následek umožnění separace s vysokým rozlišením ve většině laboratoří. Od roku 1979 tak postupně klesalo použití náplňových kolon, po roce 2000 se jich používalo již jen přibližně 20 %, a to zejména pro analýzy, kde není požadovaná separace s vysokým rozlišením, nebo není vždy žádoucí, např. analýza PCB (Grob & Barry 2004). Výpočet distribuční konstanty je uveden v Rovnici 2.

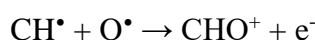
$$K_D = \frac{C_S}{C_G}$$

Rovnice 2: Distribuční konstanta se vyjadřuje jako poměr koncentrace složky vzorku v jediné určité formě ve stacionární fázi k její koncentraci v mobilní fázi.

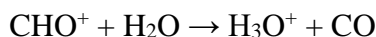
3.4.1.1.1 Plamenový ionizační detektor – FID

Plamenový ionizační detektor je nejvíce využívaným typem detektoru v plynové chromatografii. Běžně se využívá pro analýzu ropných látek, protože reaguje již při velmi nízkých koncentracích ropných uhlovodíků. Výhodou FID detektoru je, že reaguje téměř na všechny organické látky s vysokou citlivostí, nereaguje na běžné nečistoty nosného plynu, jako je oxid uhličitý a voda.

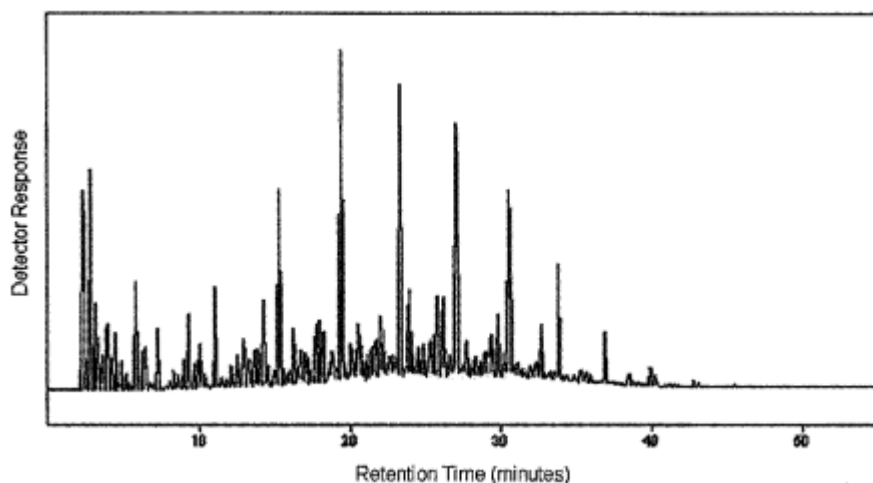
Ve chvíli, kdy organické složky ve vzorku dosáhnou plamene, tvoří se elektricky nabitě částice. Elektricky nabitě částice se hromadí na elektrodě a produkují zvýšení proudu úměrné množství uhlíku v plamenu. Výsledný proud je zesílen elektrometrem. Organické látky eluované z kolony procházejí degradačními reakcemi v prostředí bohatém na vodík a tvoří jednouhlíkové skupiny. V reakční zóně s dostupným kyslíkem dochází k následující reakci radikálových částic:



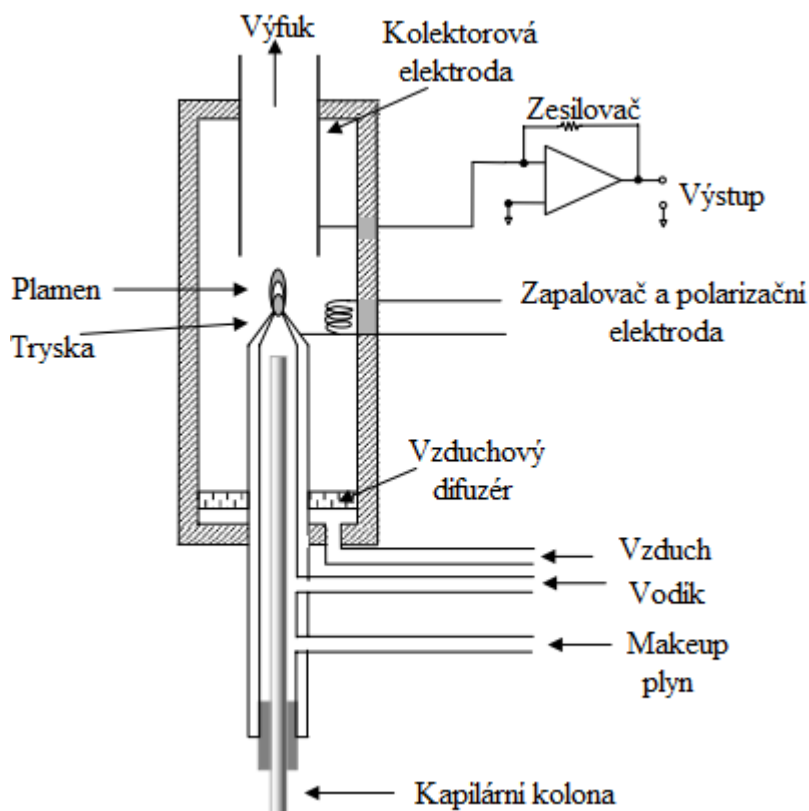
Částice CHO^+ rychle reagují s vodou vzniklou v plamenu a generují se hydroniové ionty:



Tyto kladně nabitě částice a jejich další formy jsou primární částice nesoucí pozitivní náboj. Tento proces nastává přibližně jednou za 100 000 částic uhlíku zavedených do plamene, a dá se říct, že se jedná o kvantitativní počítadlo počtu atomů spáleného uhlíku. Odezva FID detektoru je v podstatě přímo úměrná počtu atomů uhlíku, a ne hmotnosti nebo molární hmotnosti sloučeniny (Grob & Barry 2004).



Obrázek 5: Chromatogram vzorku tryskového paliva s benzínem měřeného na koloně o délce 30 m, tloušťka filmu kolony 25 μm , split injektor, detektor FID. Zdroj: Grob & Barry 2004

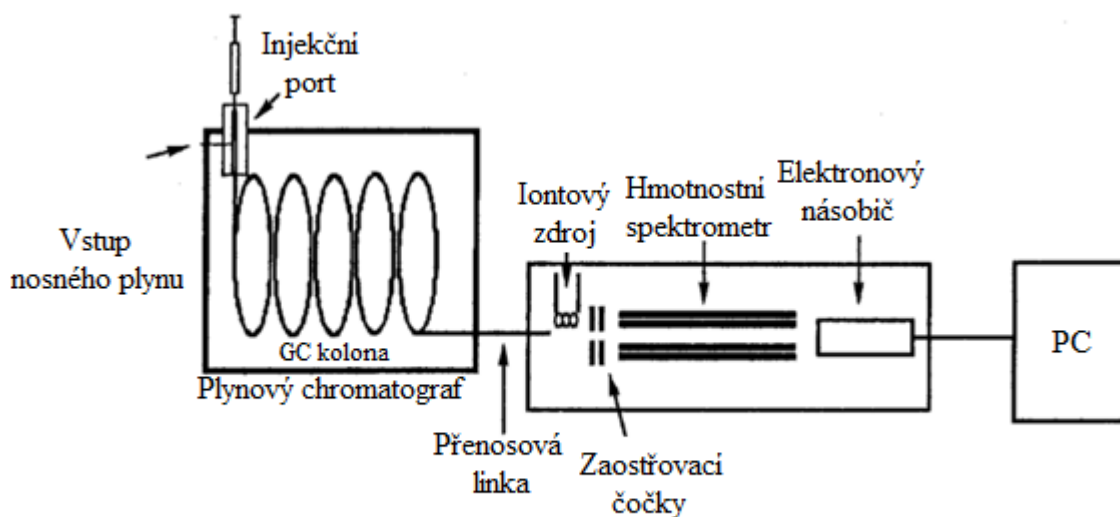


Obrázek 6: Schéma FID detektoru. Zdroj: Grob & Barry 2004

3.4.1.1.2 GC-MS

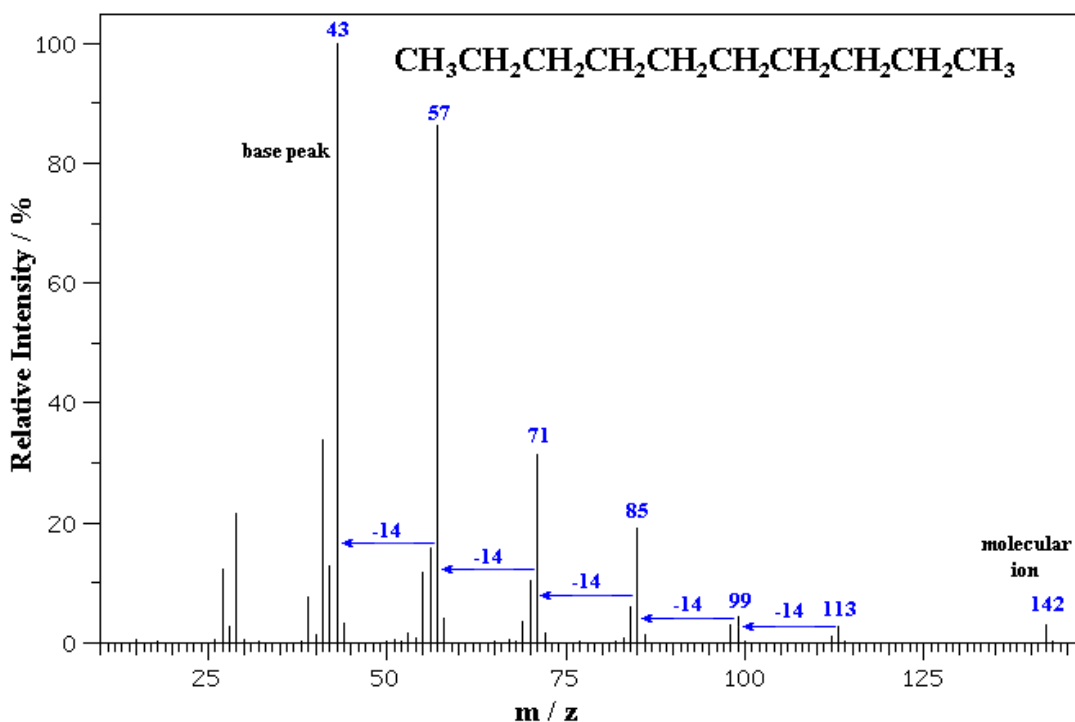
Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií kombinuje vysokou účinnost separace složek s velmi selektivní a citlivou hmotnostní detekcí. Principem je ionizace analyzovaných látek a následný vstup vzniklých iontů do hmotnostního analyzátoru, kde jsou ionty separované dle hodnoty poměru m/z , tedy hmotnosti vůči náboji. Hlavní výhodou GC-MS je možnost identifikace neznámých sloučenin pomocí zavedených a rozsáhlých spektrálních knihoven chemické a elektronové ionizace. Metody GC-MS se běžně používají pro identifikaci neznámých sloučenin a jejich přesné kvantitativní stanovení.

Pro stanovení analytů pomocí plynové chromatografie obecně je potřeba, aby stanovované analyty byly volatilní a měly dostatečnou termickou stabilitu. Toto je největší limitace GC-MS, jelikož přibližně jen 10 % všech organických látek je vhodných na přímou analýzu na GC-MS. Použitelnost techniky se dá u mnoha látek rozšířit přípravou těkavých a tepelně stabilnějších derivátů těchto látek. Další nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady.



Obrázek 7: Schéma typického systému GC-MS. Zdroj: Grob & Barry 2004.

Spektra se normálně vykreslují pomocí poměru hmotnosti k náboji (m/z) na ose x a relativní intenzitě (% I) na ose y. Protože většina iontů nese náboj 1 ($z = 1$), m/z se rovná hmotnosti iontu. Hodnota m/z má bezrozměrnou jednotku. Intenzita píku je vyjádřena jako procento intenzity základního píku.

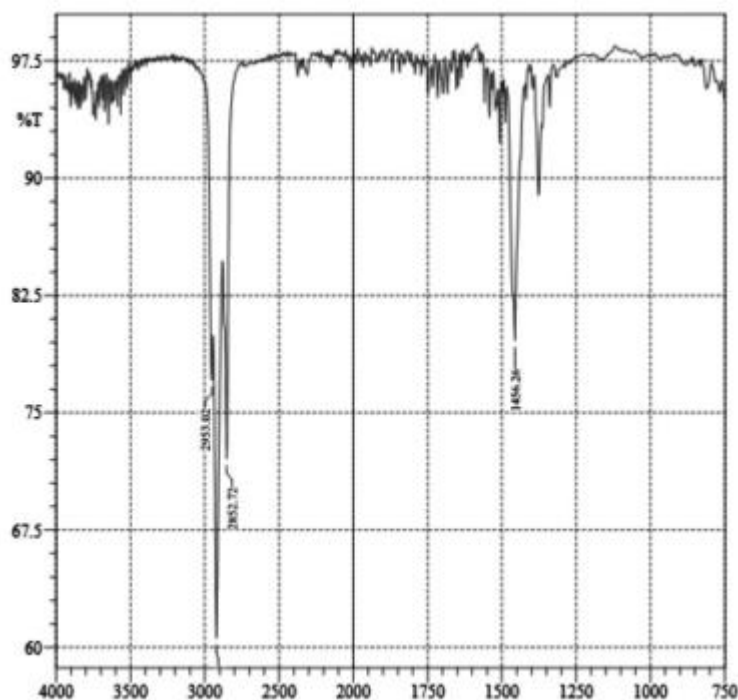


Obrázek 8: Hmotnostní spektrum *n*-dekanu, vrchol při m/z 142 představuje neporušenou molekulu *n*-dekanu a označuje se jako molekulární ion.

Zdroj: Hunt I, Department of Chemistry University of Calgary Available from <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ms-bnoh.gif> (accessed February 2022).

3.4.2 FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie je metoda identifikace a analýzy chemických sloučenin. Infračervený paprsek je nasměrován na vzorek a měřením záření, které je vzorkem absorbováno na různých frekvencích, lze stanovit, jaké typy molekul tvoří vzorek. Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FTIR) je nejběžnějším typem infračerveného spektrometru. Zaznamenává shromážděná data a transformuje data do spektra. Spektrum je zobrazeno s grafem, který ukazuje, při jaké frekvenci a k jak velké absorpci došlo. Protože různé molekuly absorbují záření na specifických frekvencích ve známých množstvích, může být spektrum použito k identifikaci vzorku na molekulární úrovni. V dnešní době je po celém světě spousta míst kontaminovaných TPH, konvenční zhodnocení rizik vyžaduje sofistikované metody vzorkování i laboratorních analýz, to je však časově i finančně nákladné. Proto se objevuje trend, který se odklání od složitých laboratorních postupů k rychlým, jednoduchým a nedestruktivním spektroskopickým metodám, které jsou použitelné i v terénu. Metoda FTIR má tu výhodu, že dokáže poskytnout informace pro rychlé *in situ* charakterizace. Koherentní pásy umístěné na vlnočtu 3000–2800 cm^{-1} poskytují důkaz o vazbě -C-H v alkanech s dlouhým řetězcem díky valenčním vibracím. Oblast těchto koherentních pásů může být použita ke kvantifikaci TPH v půdách kontaminovaných ropnými produkty. Tato jednoduchá analýza poskytuje základní data pro další postupy a analýzy (Wang et al. 2020).



Obrázek 9: FTIR spektrum konvenční nafty, na ose x je hodnota vlnočtu v cm^{-1} , na ose y transmittance T v %. Transmittance je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (Ismail et al. 2014).

3.4.3 HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro analýzu ropných uhlovodíků se využívá i metoda HPLC – metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pomocí HPLC se obvykle nestanovují rutinní analýzy ropných uhlovodíků, dá se však využít v případech, kdy vyžadujeme přesné informace o složení jednotlivých uhlovodíků např. při monitorování kvality ropných produktů jako je motorová nafta. Stanovení pomocí HPLC se hojně využívá pro polycyklické aromatické uhlovodíky. PAU petrogenního původu se do prostředí mohou dostat například haváriemi či únikem ropných látek, jelikož jsou součástí většiny ropných produktů. Analýza HPLC poskytuje podrobné informace o obsahu monocyklických, bicyklických a polycyklických aromatických uhlovodíků, nejčastěji se pro toto stanovení používá fluorescenční detektor a UV/VIS spektrofotometrický detektor (Adeniji et al. 2018).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je fyzikální separační technika prováděná v kapalně fázi. Vzorek je rozdělen na jednotlivé složky (analyty) na základě distribuce mezi mobilní fázi (proudící kapalina) a stacionární fázi (sorbent uvnitř kolony). Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se liší od základní kapalinové chromatografie tím, že používá kolonu s malými částicemi, skrz kterou je za vysokého tlaku čerpána mobilní fáze. Metoda HPLC je aplikovatelná na 60–80 % všech existujících sloučenin v porovnání s přibližně 15 % u plynové chromatografie. Nevýhodou je, že neexistuje žádný univerzální detektor, jako je například plamenově ionizační detektor v plynové chromatografii (Dong, 2019).

UV/VIS absorbanční detektor monitoruje absorbanci ultrafialového nebo viditelného záření v eluentu měřením energetického poměru paprsku vzorku vůči referenčnímu. UV/VIS detektor se skládá z deuteriové lampy, monochromátoru a malé průtokové cely. Standardní UV/VIS detektor dokáže detekovat téměř všechny PAU v rozsahu ultrafialového záření o vlnových délkách 190–360 nm a HPLC systém vybavený UV detektory je možná jednou z nejrozšířenějších analytických metod pro jednoduché a rychlé měření koncentrací PAU ve vzorcích životního prostředí (Mansouri et al. 2019).

3.5 Extrakční metody vhodné pro vzorky zemin

Nejčastější metody extrakce pro vzorky zemin a sedimentů před jejich analytickým stanovením jsou Soxhletova extrakce, extrakce ultrazvukem, mechanické protřepávání, zrychlená extrakce rozpouštědlem a superkritická fluidní extrakce. Účinnost extrakce vždy závisí na vzorku a typu použitého extrakčního činidla. Mechanická extrakce protřepáváním je vcelku jednoduchá metoda. Vzorek se třepe s rozpouštědlem, někdy se přidává vysoušedlo, jako například síran sodný, který odstraní vlhkost ze vzorku a usnadní jeho rozbití, čímž se zvětší jeho povrch pro kontakt s extrakčním rozpouštědlem (Adeniji et al. 2017).

Mechanický způsob extrakce třepáním byl vybrán pro přípravu všech vzorků v této diplomové práci. Nevýhodou oproti nejčastěji využívané Soxhletově extrakci je vysoká závislost účinnosti extrakce na typu vzorku, to by mělo být ohlédáno přidáním surrogate standardu do všech připravovaných vzorků. Surrogate standard je sloučenina s vlastnostmi podobnými stanovovaným analytům, jeho účelem je poskytnout referenční koncentraci, může nám tak poskytnout informaci o ztrátách stanovovaných analytů např. z důvodu nedostatečně

efektivní extrakce. Výhodou mechanického třepání je úspora času a vysoká kapacita – na používanou třepačku od výrobce Edmund Bühler GmbH se vejde více než 100 vzorků.

Soxhletova extrakce je vysoce účinná, ale časově velmi náročná metoda. Principem je nepřetržité zahřívání a refluxování vzorku s rozpouštědlem. Na konci získáváme vysoký objem rozpouštědla ke koncentrování. Metoda je méně vhodná pro těkavé látky. Soxhletovu extrakci používali při analýze ropných uhlovodíků např. Zrafi et al. (2013), při použití chloroformu jako rozpouštědla a extrakci po dobu 16 hodin dosahovali velmi vysoké výtěžnosti surrogate standardu *n*-ikosanu, a to v rozmezí 97,4–98,9 %.

Ultrazvuková extrakce používá zvukové vlny (ultrazvukové vibrace) pro zlepšení přechodu požadovaných sloučenin ze vzorku do rozpouštědla. Oproti Soxhletově extrakci je ultrazvuková metoda rychlejší a zároveň se používá menší objem rozpouštědla. Nevýhodou je pracnost metody, kdy je obvykle nutné provádět vícenásobnou extrakci a filtraci pro každý vzorek. Metodu ultrazvukové extrakce využívali Cortes et al. (2012), extrakčním rozpouštědlem byl v tomto případě *n*-pentan. Extrakce ultrazvukem byla 3× opakována, po 15 minutách v ultrazvuku se vzorky nechaly 30-60 minut usadit při pokojové teplotě. Výtěžnost ropných uhlovodíků u vzorků spikovaných známým množstvím stanovovaných sloučenin se u takto připravených vzorků zemin pohybovala mezi 97-99 %.

Dle Dobbeleer et al. (2016) představuje metoda ASE = accelerated solvent extraction, neboli zrychlená extrakce rozpouštědlem, vhodnou alternativu pro extrakci ropných uhlovodíků ze zemin. Tato metoda byla vyvinuta pro snížení objemu potřebného rozpouštědla a času pro extrakci organických kontaminantů z pevných vzorků. S extrakcí ASE je možné dokončit extrakci vzorku už za 20 minut, s použitím jen 50 ml extrakčního rozpouštědla. Pro vyšší účinnost extrakce organických látek z pevných vzorků využívá ASE zvýšenou teplotu a tlak. Vysoký tlak udržuje rozpouštědla v kapalném stavu i nad jejich bodem varu a tím pomáhá dosáhnout rychlé a reprodukovatelné extrakce. Z důvodu vysoké teploty extrakce není tato metoda vhodná pro semi-volatilní látky, proto se používá pro stanovení uhlovodíků s bodem varu >175 °C.

3.6 Extrakce pevnou fází

Principem extrakce pevnou fází neboli SPE (Solid Phase Extraction) je dělení látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je pevná. Analyty přechází do pevné fáze z plynné či kapalně fáze. SPE je jednou z mnoha technik používaných v průběhu analytického procesu začínajícího odběrem vzorku a končící finálním analytickým krokem, kombinuje se s dalšími technikami jako je homogenizace, koncentrace, výměna rozpouštědla a mnoho dalších za cílem získání takové formy vzorku, která je kompatibilní s analytickým přístrojem potřebným pro analýzu. Pevnou fází, na které dochází k separaci analytů tvoří sorbent, který je cíleně vybraný pro danou skupinu analytů. Rozmanitost typu sorbentů přidává metodě SPE na složitosti, ale zároveň umožňuje její využití pro široké spektrum analytů (Simpson et al. 2000). Existují rozdílné druhy sorbentů, které využívají různé síly následujících interakcí:

- Van der Waalsovy síly (nepolární)
- Vodíkové vazby nebo dipolární vazby (polární)
- Coulombické interakce (iontová výměna)

3.6.1 Silikagel

Podle odhadů je silikagel základním materiálem pro 90 % komerčně vyráběných extrakčních kolon. Zbývající 10 % tvoří florisil, oxid hlinitý, uhlík a syntetické polymery. Silikagel je amorfní, vysoce porézní, částečně hydratovaná forma oxidu křemičitého SiO_2 . Hydroxylové skupiny silikagelu umožňují jeho modifikaci chemickou vazbou různých funkčních skupin, čímž se zvýší jeho selektivita. Oxid křemičitý používaný pro SPE je v podstatě porézní a nekystalický, s obecným vzorcem $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$. Voda tvoří silanolové skupiny Si-OH, které jsou polární, a přes které mohou být vázány další organické funkční skupiny (Telepchak et al. 2004).

Silikagel je jedním z nejpoužívanějších sorbentů, díky svým vlastnostem jako je vysoká adsorpční kapacita, pórovitost a vysoká afinita k polárním molekulám. V této práci se silikagel používá k oddělení aromatické frakce – především PAU – od frakce alifatické. Předpokládá se, že mechanismus adsorpce PAU na silikagel zahrnuje čtyři hlavní kroky – transport z větší části roztoku na vnější povrch adsorbentu silikagelu, filmovou difúzi mezi hraniční vrstvou sorbent-roztok, intračasticovou difúzi PAU strukturou vnitřního póru silikagelu a adsorpci (Hall et al. 2009).

3.7 Porovnání vybraných metod pro stanovení ropných frakcí uhlovodíků

V Tabulce 4 jsou porovnány vybrané charakteristiky tří různých analytických metod určených pro stanovení ropných uhlovodíků a metody diplomové práce.

Tabulka 4: Porovnání několika vybraných charakteristik u metod zabývajících se stanovením ropných uhlovodíků.

Jednotlivé parametry metody	Metody dle autorů			
	Cortes et al. 2012	Dobbeleer et al. 2016	Zrafi et al. 2013	Metoda diplomové práce
Metoda extrakce	Ultrazvuk	ASE	Soxhletova extrakce	Mechanické třepání
Čistící/dělicí krok	Bez čištění	Florisil po extrakci	Adsorpční kapalinová chromatografie	2 g silikagel
Extrakční rozpouštědlo	<i>n</i> -pentan	<i>n</i> -hexan	chloroform	<i>n</i> -pentan
Alifatické frakce	Pouze celková frakce C6–C35	>C10–C40	>C6–C35	>C5–C40
Aromatické frakce		nestanovovány	>C6–C35	>C6–C40
Instrumentace	GC-FID	GC-FID	GC-FID	GC-FID
Kolona	DB-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm)	TRACE TR-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	HP5 (25 m × 0,32 mm × 0,52 μm)	ZB-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm)
Nástřiková technika	Splitless	Splitless	Splitless	On-Column
Dávkované množství	neuvedeno	2 μl	1 μl	5 μl
Nosný plyn	He	He	N ₂	H ₂
Teplota detektoru	320 °C	340 °C	280 °C	360 °C

3.8 Validace

Validace metody je proces, který poskytnutím objektivních důkazů potvrzuje, že byly splněny požadavky pro konkrétní zamýšlené použití nebo aplikaci metody. Objektivní důkaz potřebný pro validaci je výsledkem testu nebo jiné formy stanovení (ČSN EN ISO 9000).

Mezi validační charakteristiky se řadí:

- **Pracovní rozsah** – uzavřený interval mezi spodní a horní hladinou koncentrace analytu ve vzorku, pro který bylo validací potvrzeno, že metoda je v něm aplikovatelná a poskytuje výsledky s přijatelnou přesností a precizností. Rozsah by měl být lineární, spodní část rozsahu je většinou ohraničena limitem kvantifikace (LOQ) nebo reportování (LOR).
- **Přesnost** – těsnost shody mezi jednou naměřenou hodnotou veličiny a pravou (referenční) hodnotou měřené veličiny. Pojem přesnost není veličinou a není dán číselnou hodnotou veličiny. Měření je prohlášeno za přesnější, když nabízí menší chybu měření. V laboratoři se zjišťuje pomocí certifikovaného referenčního materiálu.
- **Preciznost** – míra shody mezi výsledky jednotlivých testů při opakované aplikaci metody na více odběrů homogenního vzorku. Vyjadřuje se jako směrodatná odchylka SD nebo relativní směrodatná odchylka RSD (variační koeficient)
- **Pravdivost měření** – těsnost shody mezi aritmetickým průměrem většího počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny. Může být vyjádřena v procentech jako výtěžnost.
- **Výtěžnost** – poměr výsledku měření ku očekávanému výsledku vyjádřen v procentech
- **Opakovatelnost** – vztahuje se na měření uskutečněné na stejném materiálu jedním analytikem s použitím stejného postupu za stejných podmínek v krátkém časovém období. Opakovatelnost se vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka RSD.
- **Mezilehlá preciznost** – vyjadřuje přesnost v rámci laboratoře v různých dnech, různých analytiky a vybavení.
- **Reprodukovatelnost** – vyjadřuje přesnost postupu aplikovaného za rozdílných podmínek, obvykle v různých laboratořích, za použití různých zařízení či získané různými analytiky
- **Limit detekce (LOD)** – nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze detekovat, ale ne nutně kvantifikovat
- **Limit kvantifikace (LOQ)** – nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze určit s přijatelnou přesností a precizností.
- **Robustnost** – měřítko schopnosti metody poskytnout stejné výsledky i přes malé změny parametrů metody. Poskytuje údaj o spolehlivosti metody za běžného použití.
- **Nejistota měření** – parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, které by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině

Některé validační charakteristiky jsou definovány tak jak je popisuje Ravichandran et al. (2010), dále je použita terminologie ze třetího vydání mezinárodního metrologického slovníku VIM3 a jeho překladu do českého jazyka publikovaného jako TNI 01 0115:2009 a volně dostupného na <https://www.unmz.cz/metrologie/slovniky/>.

4 Experimentální část

Experimentální část této diplomové práce je rozdělena do několika stěžejních částí, každá část zde bude uvedena jako samostatná podkapitola.

Jelikož metoda diplomové práce bude následně komerčně využívána firmou ALS Czech Republic, pro kterou je vyvíjena, některé parametry v experimentální části diplomové práce nebyly záměrně upřesněny (standardní navážka vzorku pro analýzu, objem přidaného extrakčního činidla, doba a rychlost mechanického třepání, přesný teplotní program měřicí metody pro GC-FID).

4.1 Laboratorní přístroje a materiál

4.1.1 Laboratorní sklo a materiál

- 100ml skleněné šroubovací vzorkovnice s PTFE septem
- skleněná Pasteurova pipeta (délka 150 mm, délka špičky 40 mm), Brand
- skleněná pipeta sklopná (špaček), objem 10 ml a 20 ml, Kavalierglass
- skleněné kolona s fritou, objem 50 ml, výroba na zakázku od sklárky
- skleněná stříkačka s pístem, objem 10 ml, výroba na zakázku od sklárky
- skleněná kolona bez frity, objem 20 ml, výroba na zakázku od sklárky
- skelná vata – Pesticide Grade Glass Wool, Supelco
- praný mořský písek, Penta
- standardizovaná zemina loamy sand – typ 2.1, LUFA Speyer
- automatická pipeta 1–5 ml, Brand
- automatická pipeta 5 ml, Brand
- 5–1000 µl plynotěsná skleněná mikrostříkačka, Hamilton
- skleněný kónický insert pro 2ml vialky, Chromservis
- 2ml skleněné vialky, VWR
- 12mm víčka se septem silikon/PTFE, Chromservis
- 11mm kleště k zavírání vialek, Chromservis
- tlustostěnné zkumavky do centrifugy s víčkem se septem PTFE
- skleněné kolonky Chromabond, Machery Nagel
- plastové kolonky Chromabond, Machery Nagel
- plastové kolonky pro frakcionaci extrahovatelných ropných uhlovodíků (EPH Fractionation SPE), Restek
- kolonky pro ropné uhlovodíky (Bond Elut TPH), Agilent
- teflonové kolonky pro extrahovatelné ropné uhlovodíky (Strata EPH), Phenomenex
- běžné laboratorní sklo

4.1.2 Přístroje a zařízení

- plynový chromatograf s FID detektorem Agilent Technologies – 7890 A

- automatický dávkovač do plynového chromatografu Agilent Technologies HP 7683
- PC se softwarem pro plynovou chromatografii – Clarity software verze 8.4
- kapilární kolona Zebron ZB-5, 30 m × 0,32 mm × 0,25 μm (Phenomenex)
- kapilární předkolona nepolární, 5 m × 0,32 mm, Merck
- bublinkový průtokoměr, Supelco
- analytické váhy s rozlišením 0,0001 g, OHAUS
- laboratorní předvážky s rozlišením 0,01 g, OHAUS
- centrifuga multifunkční, BOECO
- chladnička, Samsung
- stojan na zakoncentrování extraktů proudem dusíku, výroba na zakázku
- třepačka s horizontálně-krouživým pohybem a s nastavitelnou frekvencí kmitů a stálým rozkvyem, Edmund Bühler GmbH
- exsikátor

4.2 Chemikálie

4.2.1 Chemikálie

- *n*-Pentan pro stopovou organickou analýzu, SupraSolv, Supelco
- Aceton pro reziduální analýzu, p.a. Pestinorm VWR
- Dichlormethan pro reziduální analýzu, p.a, Supelco
- Demineralizovaná voda (Milli-Q), < 0,060 μS/cm
- Na₄PO₇ · 10H₂O (pyrofosfát), Fluka
- Síran sodný, bezvodý práškový, p.a, Supelco
- Chlorid sodný, p.a. Lach-ner
- Silikagel aktivovaný pro frakcionaci na alifatické a aromatické uhlovodíky: Silikagel 90: 0,063–0,200 mm, 70–230 mesh ASTM (aktivace: nejméně 16 hodin při 130 °C), Fluka; pak uchovávání v exsikátoru maximálně po dobu 14 dnů (sorbent oxid fosforečný)

4.2.2 Technické plyny

- vodík čistoty 5.0
- dusík čistoty ECD
- vzduch stlačený

4.3 Standardy

4.3.1 Standardy potřebné ke stanovení alifatických a aromatických frakcí ropných uhlovodíků

- Mix 17 alkanů 100 μg/ml každého v *n*-hexanu, Chromservis (směs sudých *n*-alkanů C8–C40)
- 5- α -Androstan 2000 μg/ml v dichlormethanu, Sigma-Aldrich

- Antracén, Fluka
- 1-Chloroktadekan, 10000 µg/ml v dichlormethanu, Supelco
- CRM, který obsahuje známé množství ropných uhlovodíků v pevné matici včetně certifikované hodnoty alifatických a aromatických frakcí např. TPH – Sand 1, Sigma-Aldrich
- *n*-Dekán, Merck
- *n*-Dokosan, Sigma Aldrich
- *n*-Dotriakontan, Sigma Aldrich
- Dvousložkový standard motorové nafty a lubrikačního oleje, vhodná přítomnost pristanu a fytanu, katalogové číslo BAM-K010, dodavatel Chromservis
- 2-Fluorobifenylyl 10000 µg/ml v dichlormethanu, Sigma-Aldrich
- GRO Standard alifatických uhlovodíků C6–C10, 2000 µg/ml v dichlormethanu, Absolute Standards Inc.
- Motorová nafta, vhodná přítomnost pristanu a fytanu, katalogové číslo BAM-K008, dodavatel Chromservis
- Naftalen, Fluka
- *n*-Nonan, Supelco
- *n*-Oktakosan, Merck
- Olej, např. lubrikační olej, katalogové číslo BAM-K009, dodavatel Chromservis
- *n*-Pentadekan, Labicom
- *n*-Pentakosan, Sigma Aldrich
- *n*-Pentatriakontan, Fluka
- Směsný standard 16 PAU, 2000 µg/ml každého ve směsi methylenchloridu a benzenu (1:1), Sigma-Aldrich
- Pristan, Merck
- Standardy benzínu např. bezolovnatý benzín (Unleaded Gasoline Composite) 2500 µg/ml v methanolu a letecký benzín (Restek Aviation Gasoline) 50000 µg/ml v methanolu, Restek
- Standard BTEX 2000 mg/l každého v methanolu, Neochema – obsahuje 6 analytů (Benzen, Toluen, Ethylbenzen, *m*-Xylen, *p*-Xylen, *o*-Xylen)
- *n*-Tetrakontan, Restek
- *n*-Tetrakosan, Sigma Aldrich
- *o*-Terpenyl, 10000 µg/ml v dichlormethanu, Sigma-Aldrich
- *n*-Triakontan, Sigma Aldrich
- *n*-Trikosan, Sigma Aldrich

4.3.2 Kalibrační roztoky standardů

Zásobní roztok RU (motorová nafta + olej 1:1) o koncentraci 10 mg/ml:

- Bylo naváženo 250 ±5 mg dvousložkového standardu BAM-K010 nafta/olej do 25ml odměrné baňky a doplněno po rysku *n*-pentanem.

Zásobní roztok bezolovnatého benzínu (Unleaded Gasoline Composite) o koncentraci 0,5 mg/ml:

- Do 5ml odměrné baňky bylo odměřeno 1 ml standardu bezolovnatého benzínu o koncentraci 2500 µg/ml, poté byl přidán 1 ml acetonu a baňka byla doplněna *n*-pentanem po rysku.

Řada kalibračních standardů

- Ze zásobního kalibračního roztoku byly odměřeny objemy dle Tabulky 5 do 10ml odměrných baněk, baňky byly doplněny *n*-pentanem tak, aby vznikla řada pěti roztoků s koncentracemi v rozsahu 0,055–2,25 mg ropných uhlovodíků s retenčním časem >C5–C40 na 1 ml *n*-pentanu.

Tabulka 5: Příklad kalibračních roztoků.

Kalibrační bod	Zásobní roztok RU (µl)	Zásobní roztok bezolovnatého benzínu (µl)	Výsledná koncentrace motorové nafty a oleje – RU (mg/ml)	Výsledná koncentrace bezolovnatého benzínu - (mg/ml)
K0	5	10	0,01	0,001
K1	25	50	0,05	0,005
K2	100	250	0,2	0,025
K3	250	500	0,5	0,05
K4	500	1250	1	0,125
K5	1000	2500	2	0,25

4.3.3 Pracovní roztoky standardů

Pracovní roztok 4 alifatických uhlovodíků – C10, C15, Pristan a C35 o koncentraci jednotlivých analytů 1 mg/ml:

- Do 25ml odměrné baňky bylo naváženo 25 mg *n*-dekanu, 25 mg *n*-pentadekanu, 25 mg pristanu a 25 mg *n*-pentatriakontanu, baňka byla doplněna po rysku *n*-pentanem. Z důvodu špatné rozpustnosti *n*-pentatriakontanu byl roztok po doplnění *n*-pentanem vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně.

Pracovní roztok směsi PAU (16 PAU) o koncentraci jednotlivých analytů 0,4 mg/ml:

- Do 5ml odměrné baňky bylo přidáno 1 ml standardu směsi 16 PAU o koncentraci 2000 µg/ml, následně byla baňka doplněna po rysku *n*-pentanem.

Pracovní roztok devíti *n*-alkanů o celkové koncentraci alifatických uhlovodíků v roztoku 11 mg/ml:

- Ze standardů devíti vybraných *n*-alkanů byl připraven směsný roztok navážením jednotlivých *n*-alkanů dle Tabulky 6 do 25ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna po rysku *n*-pentanem. Z důvodu špatné rozpustnosti *n*-tetrakontanu byl roztok po doplnění *n*-pentanem vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně.

Tabulka 6: Navážky a výsledné koncentrace jednotlivých *n*-alkanů v pracovním roztoku (směs devíti alifatických uhlovodíků).

Alifatický uhlovodík	Navážka (mg)	Výsledná Koncentrace v roztoku (mg/ml)
<i>n</i> -nonan - C9	30	1,2
<i>n</i> -dekan - C10	35	1,4
<i>n</i> -dokosan - C22	50	2
<i>n</i> -trikosan -C23	25	1
<i>n</i> -tetrakosan - C24	25	1
<i>n</i> -pentakosan - C25	25	1
<i>n</i> -triakontan - C30	35	1,4
<i>n</i> -dotriakontan - C32	25	1
<i>n</i> -tetrakontan - C40	25	1
Výsledný směsný roztok 9 <i>n</i> -alkanů	275	11

Pracovní roztok pyrofosfátu o koncentraci 22,5 g/L

Do 500ml odměrné baňky bylo naváženo 11,125 g pyrofosfátu a baňka byla doplněna demineralizovanou vodou Milli-Q po rysku.

Roztok ke zjištění retence jednotlivých uhlovodíků:

- Směsný standard 17 sudých *n*-alkanů se 20× naředí *n*-pentanem a analyzuje se.

4.4 Ověření čistoty používaných materiálů a chemikálií

- Pro ověření možné kontaminace plastovými špičkami bylo do 10ml zkumavky odebráno 5ml automatickou pipetou 8 ml *n*-pentanu. Objem pipety byl nastaven na 2 ml, celý objem (8 ml) byl nabrán jednou plastovou špičkou. Po odebrání byl *n*-pentan zakoncentrován proudem dusíku na objem 1 ml a změřen na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13.

- Latexová rukavice byla vložena do skleněné výživy, poté bylo do výživy přidáno 20 ml *n*-pentanu a výživa byla uzavřena. Po uzavření byla výživa krátce mechanicky protřepána v ruce. Do měřicí vialky byl po protřepání odebrán skleněnou Pasteurovou pipetou *n*-pentan a následně byl změřen na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13.
- Čistota *n*-pentanu byla ověřena jeho změřením na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13.
- Teflonová víčka pro měřicí vialky byla testována opětovným nástřikem. Do měřicí vialky byl nabrán *n*-pentan a vialka byla uzavřena teflonovým víčkem. Následně byl *n*-pentan změřen na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13. opakovaně ze stejné vialky (n=3).
- Komerční silikagelové kolonky byly promyty 10 ml dichlormethanu a následně 10 ml *n*-pentanu. Poté bylo nanášeno 6 ml *n*-pentanu, který se jímá do skleněné zkumavky a následně 6 ml dichlormethanu, který se jímá do další skleněné zkumavky. Dichlormethan i *n*-pentan ve zkumavkách byly zakonzentrovány proudem dusíku na 1 ml a následně převedeny do měřicí vialky a měřeny na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13.

4.5 Typy dělicích kolonek a jejich příprava

Pro experimentální ověření dělicího kroku byly použity 3 standardy, a to pracovní roztok PAU mix o koncentraci jednotlivých analytů 0,4 mg/ml dále pak pracovní roztok čtyř alifatických uhlovodíků o koncentraci 1 mg/ml jednotlivých uhlovodíků a standard BTEX o koncentraci jednotlivých analytů 2 mg/ml. Standardy byly vždy před nanášením na kolonku naředěny na požadovanou koncentraci *n*-pentanem do 1 ml. Na kolonku byl vždy nanášen 1 ml extraktu, aby dělicí postup odpovídal přípravě reálných vzorků.

4.5.1 Silikagelová kolonka s 0,5 g silikagelu

4.5.1.1 Příprava a použití

Kolonky byly připraveny následujícím postupem:

- Do skleněné Pasteurovy pipety byl vložen malý chomáček skelné vaty a pomocí dlouhé skleněné Pasteurovy pipety byla vata upěchována, aby byla vytvořena zátka
- Do kolonky bylo nasypáno 0,5 g aktivovaného silikagelu, poklepáním na kolonku byl silikagel zbaven přebytečného vzduchu
- Na povrch silikagelové kolonky bylo nanášeno malé množství bezvodého síranu sodného (cca 0,1 g) pro zabránění vysychání kolonky
- Následně byla kolonka kondicionována, nejprve se nanášelo 5 × 1 ml dichlormethanu a následně 5 × 1 ml *n*-pentanu
- Takto připravená kolonka byla následně připravena k použití

- Pro eluci alifatické frakce bylo použito 2 ml *n*-pentanu, aromáty byly eulovány 3 ml dichlormethanu *

**Silikagelová kolonka s 0,5 g silikagelu byla dříve využívána v laboratoři a byl u ní již známý výsledný eluční objem *n*-pentanu pro alifatickou frakci i dichlormethanu pro aromatickou frakci.*



Obrázek 10: Silikagelová kolonka s 0,5 g aktivovaného silikagelu.

4.5.1.2 Ověření dělicí kapacity kolonky

Nejprve byly kolonky testovány z hlediska jejich dělicí kapacity na 3 koncentračních hladinách pracovního roztoku C10, C15, Pristanu a C35. Koncentrace jednotlivých analytů v nanášeném extraktu byly následující: 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml. Pro každou koncentrační hladinu bylo provedeno 5 opakování.

Koncentrace jednotlivých alifatických uhlovodíků v extraktu nanášeném na kolonky odpovídá koncentracím v zemině 50 mg/kg, 250 mg/kg a 500 mg/kg – při uvažování standardního postupu (viz kapitola 4.6.1). Pro přepočet byla použita Rovnice 3 kdy za A je dosazena známá koncentrace nanášeného extraktu.

$$C = \frac{fV_e A}{m} 10^3$$

Kde:

- C je výsledná koncentrace uhlovodíků (mg/kg)
- f je ředící faktor
- V_e je objem přidaného extrakčního činidla v ml
- m je hmotnost vzorku v gramech
- A je koncentrace extraktu v mg/ml vypočtena z kalibrace dle integrované plochy píků extraktu vzorku

Rovnice 3: Vztah pro výpočet obsahu uhlovodíků v zeminách. Tento vztah byl použit jak pro výpočet celkových uhlovodíků (alifatická + aromatická frakce), tak pro výpočet alifatické a aromatické frakce.

Druhý experiment byl prováděn nanesením směsného standardu 16 PAU. Byly nanášeny 4 různé koncentrace jednotlivých PAU: 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml. Pro každou koncentrační hladinu byly provedeny 4 opakování. Koncentrace jednotlivých PAU v extraktu nanášeném na kolonky odpovídá koncentracím v zemině 5 mg/kg, 10 mg/kg a 50 mg/kg a 100 mg/kg – při uvažování standardního postupu (kapitola 4.6.1) – viz Rovnice 3.

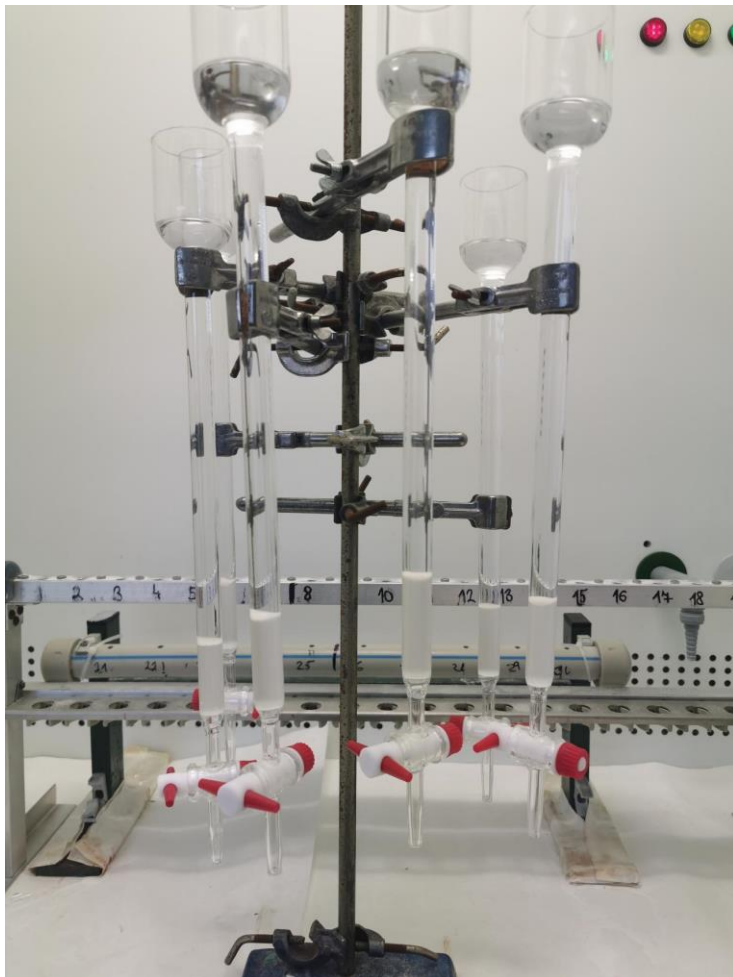
4.5.2 Skleněná kolonka o objemu 50 ml s fritou, 2 g silikagelu

4.5.2.1 Příprava kolonky

Kolonky byly připraveny následujícím postupem:

- Byla uzavřena spodní výpušť a následně bylo do kolonky odměrným válcem přidáno 10 ml dichlormethanu.
- Mechanickým klepáním na kolonku byl odstraňován vzduch, který zůstává především ve fritě.
- V malé kádince byla připravena suspenze z 2 g silikagelu a 10 ml dichlormethanu.
- Připravená suspenze silikagelu byla nalita do kolony, následně byla kádinka propláchnuta malým množstvím dichlormethanu (cca 5 ml) a ten byl opět nanesen na kolonku.
- Bylo ověřeno, že vzniklý sloupec silikagelu je jednotný, bez bublinek, prasklin a jiných viditelných narušení.
- Bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného (0,2 g), který navrchu kolony tvoří zátku a jímá vzdušnou vlhkost.
- Z kolonky byl vypuštěn veškerý dichlormethan a následně byla výpušť opět uzavřena.
- Na kolonku bylo co nejrychleji nanášeno 15 ml *n*-pentanu.

- Takto připravená kolona byla po vypuštění *n*-pentanu připravena k použití, *n*-pentan byl vypuštěn těsně před nanášením extraktu na kolonku.



Obrázek 11: Silikagelová kolona s fritou o objemu 50 ml s 2 g aktivovaného silikagelu.

4.5.2.2 Stanovení elučního profilu

Eluční profil skleněné kolonky s fritou byl stanoven následovně:

- Pro experimenty byly na základě odhadu objemu naplněné kolonky vybrány 4 různé eluční objemy pro alifatickou frakci - 6 ml, 7 ml, 8 ml a 9 ml *n*-pentanu
- Každý experiment byl proveden v duplikátu.
- Na kolonku připravenou postupem z kapitoly 4.5.2.1 byl nanesen 1 ml směsného roztoku 4 alifatických uhlovodíků (C10, C15, pristan a C35) a BTEX v *n*-pentanu. Koncentrace BTEX i C10, C15, pristanu a C35 v nanášeném roztoku byla 0,04 mg/ml jednotlivých látek.
- Následně byl na kolonku nanášen *n*-pentan po 1 ml až do finálního testovaného elučního objemu pro alifatickou frakci (6–9 ml).

- Každý 1 ml nanášeného *n*-pentanu byl jímán do měřicí vialky, která byla označena podle posloupnosti od počátku jímání.
- Následná eluce aromatické frakce dichlormethanem byla provedena stejným postupem.
- Aromatická frakce byla eluována stejným objemem u všech experimentů – 10 ml dichlormethanu.
- Označené vialky byly následně změřeny na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13.
- Z výsledků všech měření byl stanoven eluční profil a na jeho základě byl vybrán nejvhodnější eluční objem *n*-pentanu pro alifatickou frakci.

4.6 Příprava vzorků zemin

4.6.1 Extrakční metoda

Do 100ml skleněné šroubovací vzorkovnice s PTFE septem byl navážen homogenní vzorek, ke vzorku bylo přidáno 20 ml pracovního roztok pyrofosfátu o koncentraci 22,5 g/L. Extrakce byla provedena do *n*-pentanu mechanickým třepáním.

Po ukončení třepání byly vzorky ponechány 5 minut na stole, aby došlo k ustálení fází. Horní pentanová fáze byla odebrána pomocí skleněné Pasteurovy pipety do tlustostěnných centrifugačních zkumavek s víčkem. Odebrané extrakty byly odstředěny při rychlosti otáček 2500/minutu. Zkumavky byly po odebrání extraktu uzavřeny.

S každým stanovením byl vždy připraven slepý vzorek MB (method blank) pro ověření čistoty a odhalení případné kontaminace během přípravy. MB byl připraven standardně (viz výše) jako vzorek zeminy, kdy místo zeminy bylo navážen mořský praný písek, který je čistý a neobsahuje žádné stanovované analyty.

4.6.2 Použití „surrogate“ standardu

Při optimalizaci a validaci metody byly testovány následující látky za účelem použití jako tzv. surrogate standardy: 2-Fluorbifenyl; *o*-Terpenyl; 5- α -Androstan; 1-Chloroktadekane. Standardy byly před použitím naředěny *n*-pentanem na koncentraci 50 μ g/ml. Byla provedena série experimentů ($n=2$) pro každý z testovaných standardů. Na silikagelovou kolonku připravenou dle postupu v kapitole 4.5.2.1 byl vždy nanesen roztok *n*-pentanu obsahující jeden z testovaných standardů o koncentraci 50 μ g/ml. Z kolonky byly následně eluovány alifatická a aromatická frakce dle standardního postupu uvedeného v kapitole 4.6.3. Zakoncentrované finální extrakty byly měřeny na GC-FID za podmínek uvedených v Tabulce 13.

4.6.3 Finální zpracování extraktu po dělicím kroku

Extrakt vzorku získaný postupem uvedeným v kapitole 4.6.1 byl rozdělen na alifatickou a aromatickou frakci následujícím postupem:

Z centrifugační zkumavky, do které byl odebrán extrakt vzorku po mechanickém třepání bylo odebráno 1 ml extraktu a nanášeno na připravenou skleněnou silikagelovou kolonu

s nálevkou (kapitola 4.5.2.1). Pod kolonku byla vložena 15ml zkumavka a následně byla jímána alifatická frakce (8 ml *n*-pentanu), poté byla do další 15ml zkumavky jímána aromatická frakce (15 ml dichlormethanu). Obě zkumavky byly následně umístěny na foukací aparaturu, kde byly zakoncentrovány proudem dusíku na finální objem 0,5 ml. Zakoncentrované extrakty byly převedeny do měřicí vialky, zavřeny a měřeny na GC-FID dle parametrů uvedených v Tabulce 13. Tento postup je validní pro skleněnou kolonu s nálevkou (kapitola 4.5.2.), která byla vybrána jako vhodná varianta po sérii experimentů zahrnujících i stanovení elučního profilu.

4.7 Optimalizace měřicí GC metody

Byl otestován vliv následujících faktorů na opakovatelnost retenčních časů *n*-alkanů C6–C10:

- **Aplikace předkolony** – standard *n*-alkanů C6–C10 (GRO) byl naředěn *n*-pentanem na koncentraci 20 µg/ml jednotlivých analytů a následně byl opakovaně změřen (n=15) na koloně bez aplikované předkolony, poté byla aplikována předkolona a standard byl změřen za stejných podmínek znovu (n=14). Rychlost nástřiků u všech experimentů byla nastavena na 800 µl/min.
- **Dávkovací rychlosti** – standard *n*-alkanů C6–C10 (GRO) byl naředěn *n*-pentanem na koncentraci 20 µg/ml jednotlivých analytů a následně byl opakovaně změřen (n=15) na koloně s aplikovanou předkolonou při dvou různých rychlostech nástřiku 600 µl/min a 1000 µl/min.
- **Průtok mobilní fáze kolonou** – standard sudých *n*-alkanů C10–C40 byl naředěn *n*-pentanem na koncentraci 5 µg/ml jednotlivých analytů a následně byl změřen na koloně s aplikovanou předkolonou a rychlostí nástřiku 600 µl/min při třech různých hodnotách průtoku mobilní fáze kolonou: 4 ml/min, 5 ml/min a 6 ml/min.

Teplotní program měřicí metody pro GC-FID byl pro všechny experimenty v kapitole 4.7 shodný a je uvedený v Tabulce 13 (strana 49).

4.8 Vlastní stanovení, nastavení přístroje

Na základě výsledků experimentů z kapitoly 4.7, byly nastaveny pracovní podmínky měření na GC. Výsledné použité podmínky jsou uvedeny v Tabulce 13, v kapitole 5.5 (strana 49).

4.9 Vyhodnocování naměřených záznamů

Všechny extrakty změřené na GC-FID byly vyhodnocovány pomocí software programu Clarity. Pro zjištění retenčních časů jednotlivých *n*-alkanů potřebných k rozdělení stanovovaných frakcí byl před každým měřením vzorků změřen směsný standard 17 sudých *n*-alkanů uvedený v kapitole 4.3.3. Chromatogram byl rozdělen na jednotlivé požadované frakce za pomoci zjištěných retenčních časů jednotlivých *n*-alkanů a následně byly integrovány celé plochy těchto frakcí.

4.10 Validační charakteristiky

Pro určení validačních charakteristik optimalizované metody byly využity dva typy komerčně dostupných matic:

- na nižších koncentračních hladinách byl jako matrice použit mořský praný písek, který neobsahuje žádné cílové analyty.
- pro vyšší hladiny byla použita standardizovaná zemina od výrobce LUFA Speyer typu loamy sand, kterou výrobce značí jako typ 2.1.

Obsah sušiny u obou využívaných matic byl > 95 %. U experimentů z kapitoly 4.10.3.1 byly použity také reálné vzorky zemin.

4.10.1 Linearita a pracovní rozsah metody

Rozsah a linearita metody pro celkovou frakci ropných uhlovodíků >C5–C40 byl validován proměřením kalibrační křivky v koncentračních rozmezích 0,011–2,25 mg/ml, to odpovídá koncentracím 5,5–1125 mg/kg celkových ropných uhlovodíků >C5–C40 ve vzorku (při uvažování standardní přípravy uvedené v kapitole 4.6).

4.10.2 Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ)

Mez detekce i kvantifikace byly stanoveny na základě experimentálního vyhodnocení variability vzorků měřených pro každou frakci zvlášť, a to dvěma přístupy.

A) Pro stanovení bylo připraveno 10 slepých vzorků MB = method blank. Všechny MB byly připraveny dle standardního postupu (kapitola 4.6), jako matrice byl použit praný mořský písek.

B) Pro ověření bylo také připraveno 10 experimentů pro celkové frakce >C5–C40 Alifatická frakce a >C6–C40 Aromatická frakce. Jako matrice byl opět použit mořský praný písek. Vzorky písku byly obohaceny stanovovanými analyty dle Tabulky 7 a dále připraveny standardním postupem (kapitola 4.6). K obohacení vzorků byly použity standardy z kapitoly 4.3.3 a komerční standard BTEX o koncentraci jednotlivých analytů 2000 µg/ml. Přidávaný objem standardů byl vypočítán tak, aby výsledné koncentrace ve frakcích >C5–C40 Alifatická frakce a >C6–C40 Aromatická frakce odpovídaly přibližně jedné polovině požadovaného limitu reportování metody. Všechny experimenty byly měřeny na GC-FID za podmínek uvedených v Tabulce 13 (strana 49).

Tabulka 7: Příprava koncentrační hladiny odpovídající přibližně ½ požadovaného limitu reportování celkové alifatické a aromatické frakci obohacením praného mořského písku.

	BTEX standard (6 analytů), koncentrace 2000 µg/ml jednotlivých analytů	Pracovní roztok PAU (16 PAU) o koncentraci 0,4 mg/ml jednotlivých analytů	Pracovní roztok devíti <i>n</i> -alkanů o celkové koncentraci roztoku 11 mg/ml
Objem přidaného standardu	7,5 µl	50 µl	50 µl
Referenční hodnota koncentrace (mg/kg)	4,5	16	27,5
Referenční hodnota ověřovaných frakcí (mg/kg)	>C6–C40 Aromatická frakce: 20,5		>C5–C40 Alifatická frakce: 27,5

Limit detekce byl vypočítán na základě variability opakovaných měření slepých vzorků metody. Variabilita je vyjádřena jako standardní směrodatná odchylka (SD). Limit kvantifikace LOQ je vyjádřen jako násobek LOD. Výpočty SD, LOD a LOQ jsou uvedeny v Rovnicích 4–6.

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Rovnice 4: Vypočet směrodatné odchylky, \bar{x} je průměr hodnot, N je počet opakování.

$$LOD = (MB_x + t(n-1))SD$$

Rovnice 5: vypočet LOD, kde MB_x je průměrná koncentrace v mg/kg, $t(n-1)$ je Studentova kritická hodnota pro jednostranný test pro $(n-1)$ stupňů volnosti na hladině významnosti 98,7 % a SD je standardní směrodatná odchylka. Pro výpočet byla použita hodnota z tabulky kritických hodnot pro studentovo rozdělení. Jednotky LOD jsou mg/kg vzorku, případně mg/ml extraktu.

$$LOQ = K \times LOD$$

Rovnice 6: vypočet LOQ, kde K je násobící faktor, obvykle 3 nebo 3,33, jednotky jsou mg/kg vzorku případně mg/ml extraktu. Pro výpočet v diplomové práci byl použit $K = 3,33$.

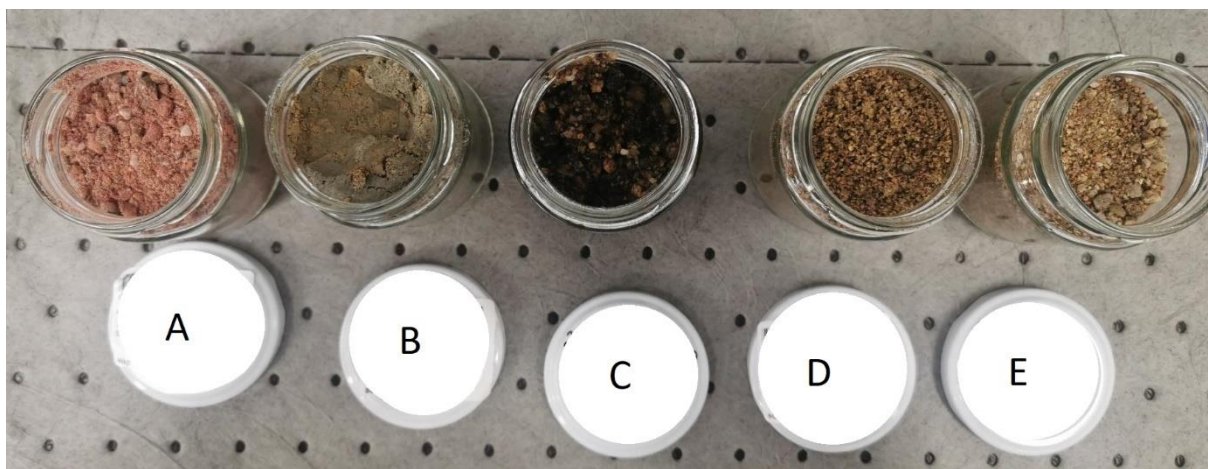
4.10.3 Pravdivost, preciznost, přesnost

4.10.3.1 Odhad pomocí obohacených (fortifikovaných) vzorků

Preciznost a pravdivost metody byla vypočítána z experimentů na dvou koncentračních hladinách. Hodnota preciznosti byla získána z opakovatelnosti na koncentrační hladině 1000 mg/kg a 190 mg/kg pro celkovou frakci >C5–C40. Pokusy na obou hladinách byly provedeny v deseti opakováních pro hladinu 190 mg/kg a 12 opakování pro 1000 mg/kg. Pravdivost byla stanovena porovnáním průměru všech měření dané koncentrační hladiny s její referenční hodnotou.

Hladina 1000 mg/kg byla připravena obohacením matrice mořského praného písku, který neobsahuje žádné stanovované analyty. K navážce praného mořského písku bylo přidáno 20 mg ± 2 mg čistého standardu BAM-K010 (standard nafty a lubrikačního oleje v poměru 1:1), následně byly vzorky zpracovány standardním postupem (kapitola 4.6) a měřeny na GC-FID s parametry uvedenými v Tabulce 13 (strana 49).

Pro experimenty na koncentrační hladině 190 mg/kg ropných uhlovodíků byly vyhledány reálné vzorky zemin. Bylo vybráno 5 různých zemin, pro ověření vlivu různých matric na analýzu. U všech vybraných zemin byl známý výsledek analýzy parametru C10–C40, byly vybrány vzorky, kde výsledek parametru C10–C40 ve vzorku odpovídal hodnotě <10 mg/kg.



Obrázek 12: 5 vybraných matric reálných vzorků zemin použitých pro experimenty na hladině 190 mg/kg.

Vzorky reálných matric byly označeny písmeny A–D, vzorek A byl jemný písek s obsahem větších kamínků a obsahem sušiny 99 %, vzorek B byl jílovitá zemina homogenního charakteru s obsahem sušiny 85,4 %, vzorek C byla zemina s vyšším obsahem vody a menšími kamínky – sušina byla 70,2 %, vzorek D byl vlhký písek se sušinou 94,3 % a vzorek E byl písek s obsahem kamínků různých velikostí a sušinou 97,9 %. Všechny zeminy byly naváženy v duplikátu a následně byly obohaceny podle Tabulky 8. Pro obohacení vzorků na požadovanou koncentrační hladinu byl použit standard směsi 16 PAU o koncentraci 2000 mg/ml a pracovní roztok devíti *n*-alkanů o celkové koncentraci alifatických uhlovodíků v roztoku 11 mg/ml

(kapitola 4.3.3). Obohacené vzorky byly zpracovány standardním postupem (kapitola 4.6) a následně byly měřeny na GC-FID s parametry uvedenými v Tabulce 13 (strana 49).

4.10.3.2 Odhad pomocí certifikovaného referenčního materiálu

Pro ověření přesnosti metody byl použit také certifikovaný referenční materiál TPH – Sand 1, u kterého výrobce uvádí výsledky pro některé ze stanovovaných frakcí metody diplomové práce. Ověření bylo provedeno v duplikátu. Do 100ml skleněné šroubovací vzorkovnice s PTFE septem bylo naváženo 5 g CRM materiálu, který byl následně zpracován standardním postupem uvedeným v kapitole 4.6. Finální extrakty byly změřeny na GC-FID s parametry uvedenými v Tabulce 13 (strana 49).

Tabulka 8: Příprava hladiny 190 mg/kg celkové alifatické a aromatické frakce >C5–C40 obohacením vzorků reálných matic.

Hladina 190 mg/kg	mix PAU (16 analytů), koncentrace 2000 µg/ml jednotlivých analytů	Pracovní roztok devíti <i>n</i> -alkanů o celkové koncentraci roztoku 11 mg/ml
Objem přidaného standardu opakování (µl)	50 µl	200 µl
Referenční hodnota ověřovaných frakcí (mg/kg)	>C6–C40 Aromatická frakce: 80 mg/kg	>C5–C40 Alifatická frakce: 110 mg/kg

Pro vyjádření preciznosti a opakovatelnosti byla vypočítána relativní směrodatná odchylka RSD, výpočet je uveden v Rovnici 7. Pravdivost byla vyjádřena jako výtěžnost průměrné hodnoty dané koncentrační hladiny – viz Rovnice 8.

$$RSD(\%) = \frac{SD(\text{směrodatná odchylka})}{\text{Průměrná koncentrace obohaceného vzorku}}$$

Rovnice 7: Vypočet relativní směrodatné odchylky

$$\text{Výtěžnost (\%)} = \frac{\text{Průměrná koncentrace obohaceného vzorku}}{\text{Referenční koncentrace}}$$

Rovnice 8: Vypočet výtěžnosti pro vyjádření pravdivosti

4.10.4 Reprodukovatelnost metody

Pro ověření reprodukovatelnosti metody byly připraveny 2 série experimentů po pěti opakováních na hladině 190 mg/kg. Postup přípravy byl shodný s přípravou vzorků reálných matric zemin v kapitole 4.9.3. Byla použita standardizovaná zemina „loamy sand“ – typ 2.1, LUFA, která byla obohacena o stanovované analyty na koncentrační hladinu 190 mg/kg (Tabulka 8). Na základě sepsaného standardního operačního postupu byly obě série experimentů připraveny dvěma různými pracovníky. Výsledky obou sérií experimentů byly porovnány a jsou uvedeny v Tabulce 22.

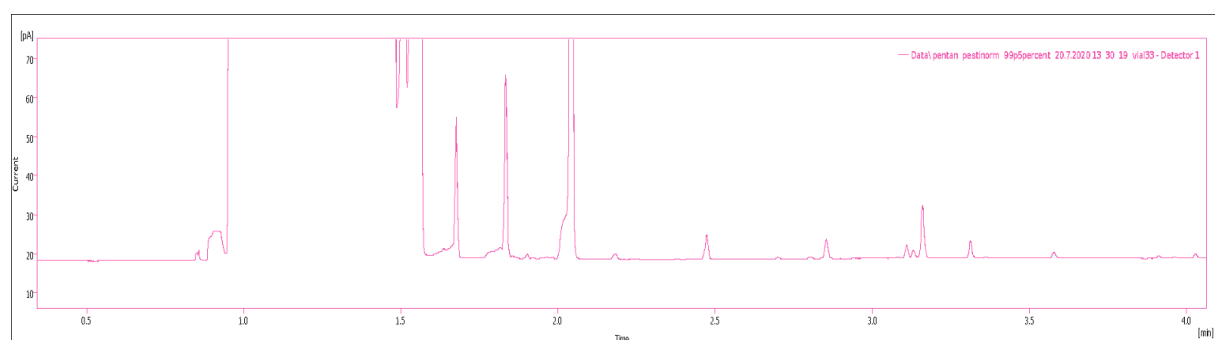
4.10.5 Rozšířená nejistota metody

Pro výpočet nejistoty byla použita metoda „top-down. Získaná hodnota byla vynásobena faktorem 2 (faktor 1,96 je rozšíření pro pokrytí 95 % výsledků). K výpočtu byly použity všechny experimenty, pro které byla známá referenční hladina, pro frakci >C5–C40 byly použity výsledky z koncentračních hladin 48 mg/kg, 190 mg/kg a 1000 mg/kg, pro >C5–C40 alifatickou frakce hladiny 27,5 mg/kg a 110 mg/kg a pro >C6–C40 aromatickou frakci pak koncentrační hladiny 20,5 mg/kg a 80 mg/kg. Rozšířená nejistota metody byla stanovována pro každou z výše uvedených frakcí zvlášť.

5 Výsledky

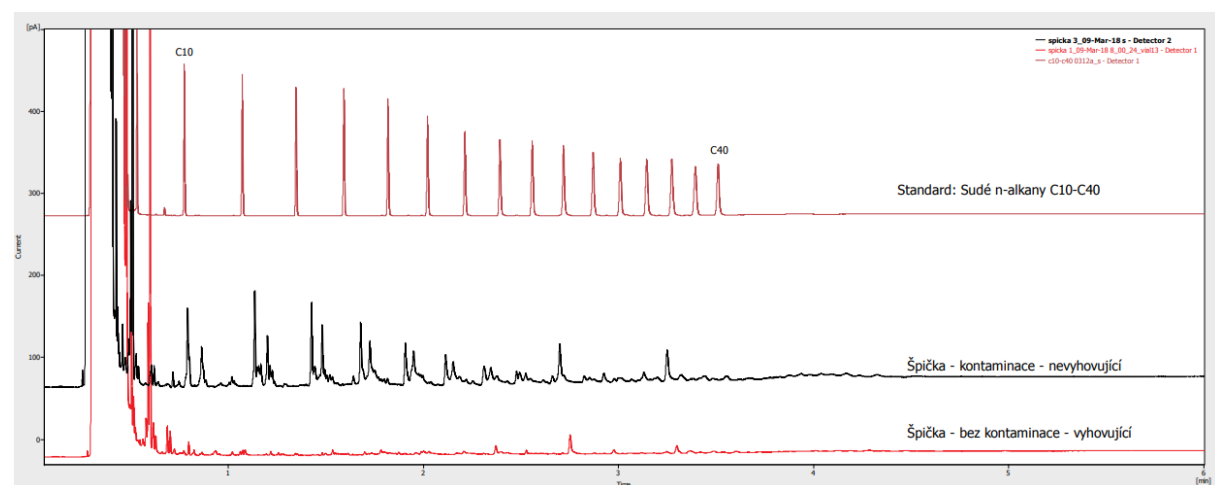
5.1 Nejčastější zdroje kontaminace z přípravy

Před zahájením experimentů byly otestovány pomůcky a materiál, které mohou interakcí s používanými chemikáliemi kontaminovat měřený extrakt. Bylo otestováno i extrakční rozpouštědlo *n*-pentan. Na následujících obrázcích 13-17 jsou zobrazeny chromatografické profily testovaných pomůcek a materiálů, které mohou způsobit kontaminaci interferujícími látkami během standardní přípravy zemin pro stanovení ropných látek. Všechny materiály a pomůcky uvedené v této kapitole obsahem interferentů přesahují požadovaný limit reportování minimálně u jedné ze stanovovaných frakcí metody diplomové práce a nejsou proto vhodné pro použití.

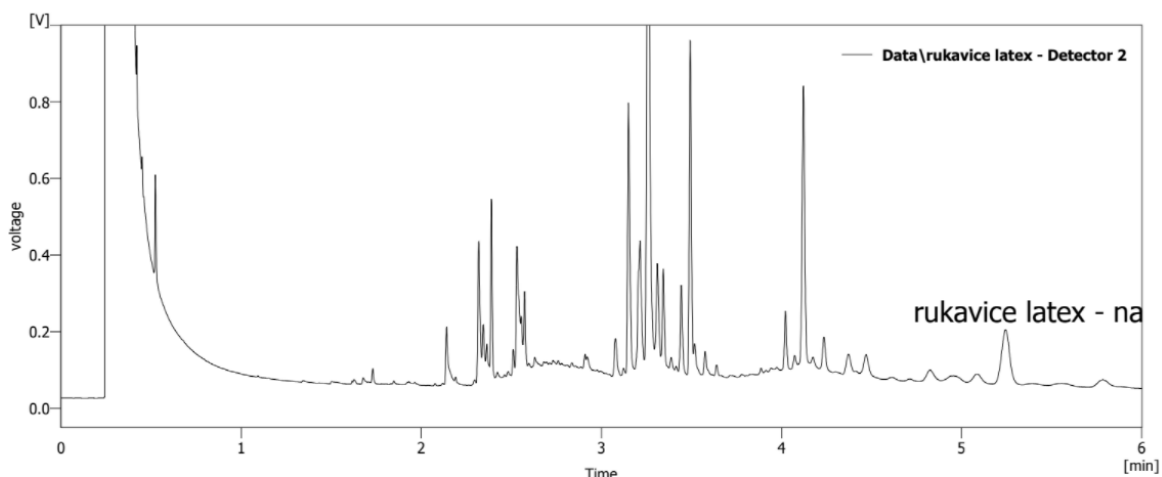


Obrázek 13: Chromatografický profil *n*-pentanu s čistotou 99,5 % od VWR, Pestinorm.

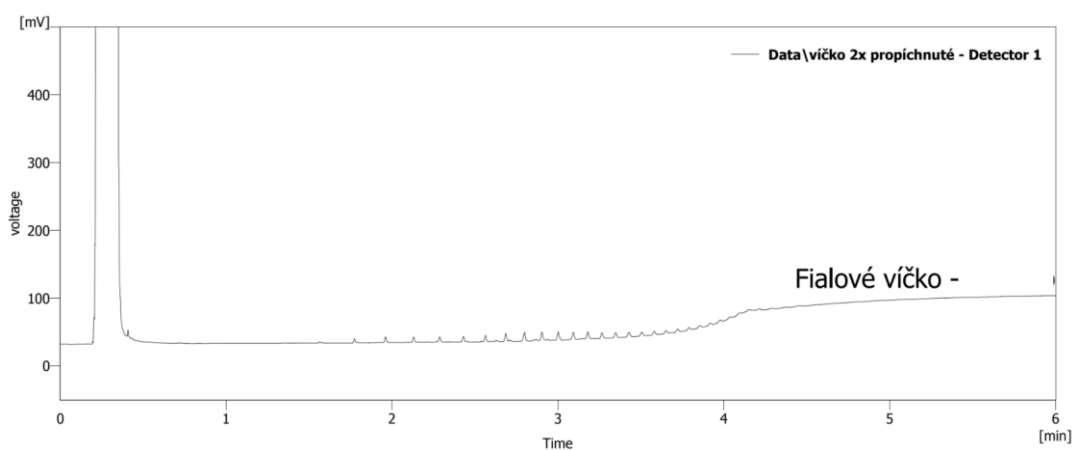
Na obrázku 13 je demonstrován příklad kontaminovaného *n*-pentanu interferujícími látkami. Tyto látky se eluují již od 1,5 minuty, což odpovídá konci eluční zóny *n*-pentanu a zasahují tak zóny integrace předních frakcí >C5–C10. Výsledky stanovení by v případě tohoto rozpouštědla byly značně nadhodnocené a nebylo by možné dosáhnout požadovaných limitů reportování. Další příklady kontaminací jsou zobrazeny na obrázcích 14-17.



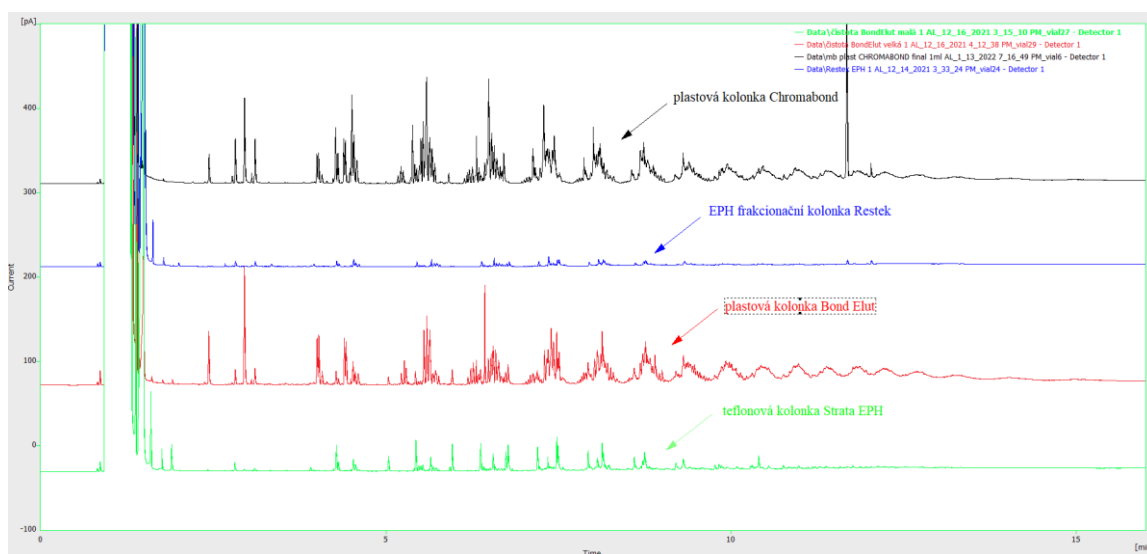
Obrázek 14: Chromatografické profily kontaminace z plastových špiček používaných s 5ml automatickou pipetou. Pro porovnání je také přeložen standard sudých *n*-alkanů C10–C40.



Obrázek 15: Chromatografický profil kontaminace latexovou rukavicí.



Obrázek 16: Chromatografický profil čistého *n*-pentanu kontaminovaného již propíchnutým víčkem měřící vialky, intenzita kontaminace se může lišit.



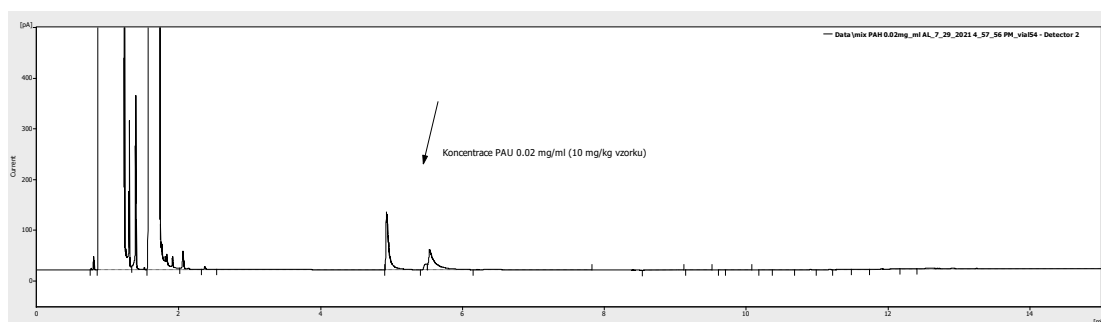
Obrázek 17: Chromatografické profily slepých stanovení komerčních silikagelových kolonek.

5.2 Kapacita silikagelové kolonky

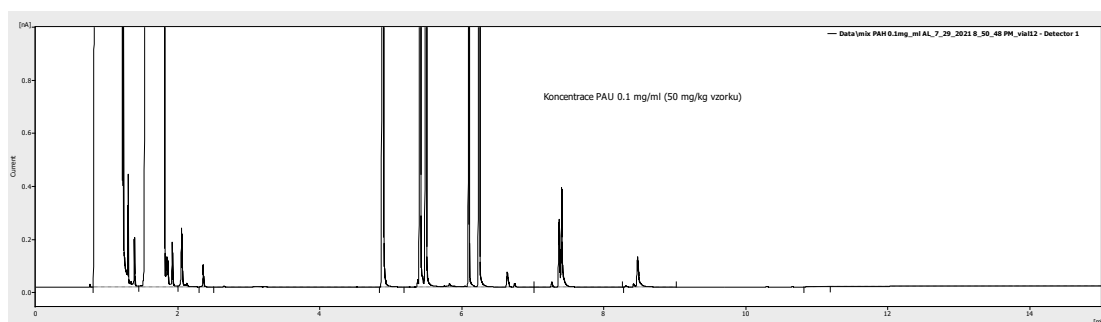
Při zvažování možností přípravy dělicích kolonek se nejprve vycházelo z texaské normy TNRCC Method 1005, TNRCC Method 1006. V této normě používají pro podobné stanovení silikagelové kolonky s 2 g aktivovaného silikagelu. Byla otestována také možnost přípravy menších kolonek, naplněných pouze 0,5 g aktivovaného silikagelu.

5.2.1 Skleněné kolonky s 0,5 g silikagelu

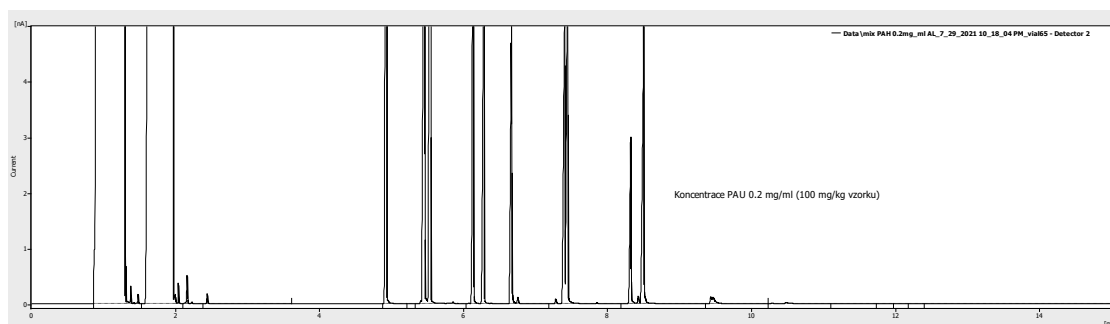
Bylo provedeno několik sérií experimentů, kdy byla ověřována správnost dělicího kroku. Při testování možnosti použití dělicích kolonek naplněných pouze 0,5 g silikagelu bylo zřejmé, že tyto kolonky mají velmi nízkou dělicí kapacitu již při nanesení extraktu PAU o koncentraci odpovídající hladině 10 mg/kg ve vzorku zeminy (při standardním postupu a navážce) bylo možné pozorovat, že některé PAU přecházejí do alifatické frakce. U vyšších koncentrací PAU - 50 mg/kg a 100 mg/kg byl pak dělicí krok téměř neúčinný. Obrázky 18–20 zobrazují, jak se stoupající koncentrací PAU přechází tyto látky do alifatické frakce.



Obrázek 18: Chromatografický profil extraktu alifatické frakce při nanesení standardu PAU o koncentraci 0,02 mg/ml.



Obrázek 19: Chromatografický profil extraktu alifatické frakce při nanesení standardu PAU o koncentraci 0,1 mg/ml.



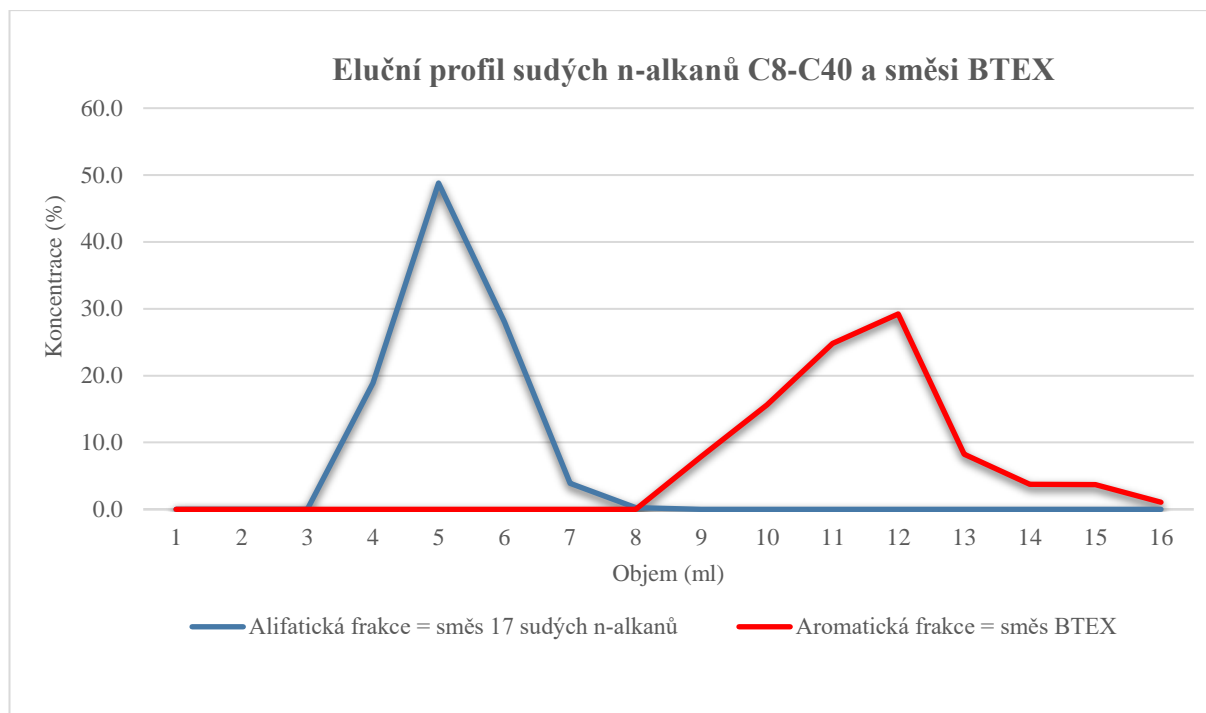
Obrázek 20: Chromatografický profil extraktu alifatické frakce při nanesení standardu PAU o koncentraci 0,2 mg/ml.

5.2.2 Velké skleněné kolonky s 2 g silikagelu

V případě použití skleněných kolonek s 2 g silikagelu (kapitola 4.5.2) došlo ke správnému rozdělení aromatických látek na všech testovaných koncentračních hladinách, které byly testovány. U experimentů, pro které byla známá referenční hodnota koncentrace aromatických látek (koncentrace aromatických látek 20,5 mg/kg a 80 mg/kg) byly výsledky výtěžnosti aromatických látek v aromatické frakci v rozmezí 89,5–124,9 %.

5.3 Eluční profil silikagelové kolonky

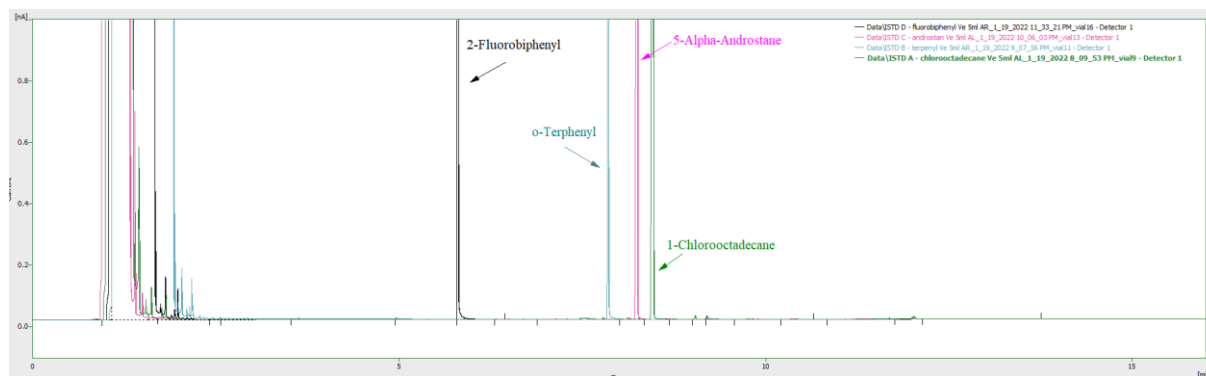
Výsledný eluční objem alifatické frakce pro skleněné kolonky s nálevkou, které byly vybrány jako nejvhodnější alternativa pro vyvíjenou metodu byl stanoven na základě elučního profilu standardu sudých *n*-alkanů a BTEX. Byla vybrána hodnota, při které nedochází k vymývání BTEX do alifatické frakce a zároveň v aromatické frakci nejsou žádné alifatické uhlovodíky. Na Obrázku 21 je graf znázorňující obsah alifatických a aromatických uhlovodíků v závislosti na eluovaném objemu a rozpouštědle (*n*-pentan pro alifatickou frakci a dichlormethan pro aromatickou frakci). Z Obrázku 21 je patrné, že pík alifatických látek nastává kolem 5 ml a 1–3 ml neobsahuje ještě žádné měřené analyty, pík směsi BTEX je kolem 11 ml (4 ml aromatické frakce) a u směsi PAU se bude lišit, protože BTEX se vymývají z aromatických látek nejdříve. U nízkých koncentračních hladin aromatických látek jsou všechny analyty vymyty už od 8 ml aromatické frakce. Protože u reálných vzorků není předem známá koncentrace a typ kontaminantů, aromatická frakce se vždy eluuje 15ml dichlormethanu.



Obrázek 21: Eluční profil sudých n-alkanů C8–C40 a směsi BTEX, skleněná kolonka s nálevkou, 2 g silikagelu. Na ose objemu 1–8. ml *n*-pentan, 9. –18. ml dichlormethan.

5.4 Surrogate standard

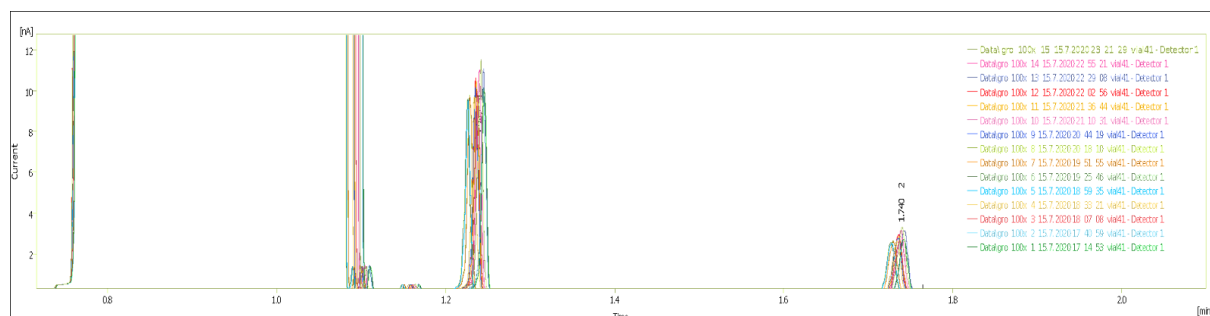
Byla ověřena správnost rozdělení 4 látek uvedených v kapitole 4.6.2 a zjištěn jejich retenční čas. U všech testovaných standardů došlo ke správnému rozdělení na silikagelové kolonce. 2-Fluorbifenyl a *o*-Terpenyl ze skupiny aromatických uhlovodíků se eluovaly v aromatické frakci a 5- α -Androstan i 1-Chloroktadecan patří do skupiny alifatických uhlovodíků ve frakci alifatické. Na Obrázku 22 jsou přes sebe přeloženy chromatogramy všech testovaných standardů a lze tak porovnat jejich retenční čas.



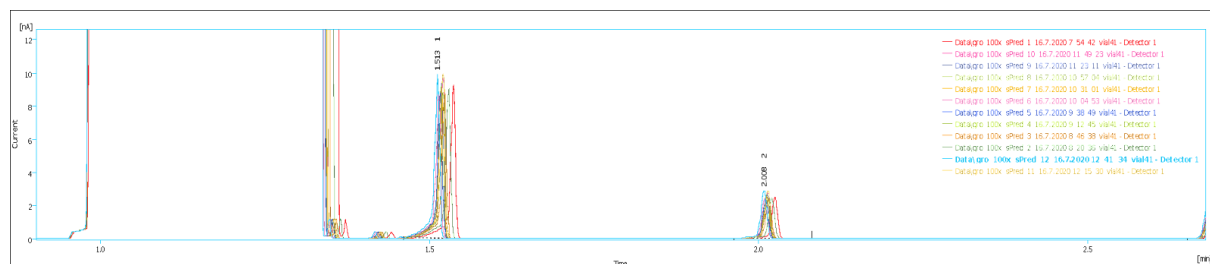
Obrázek 22: Chromatogramy 4 testovaných standardů přeložené přes sebe.

5.5 Výsledná měřicí GC metoda

Na Obrázku 23 a 24 lze vidět porovnání opakovatelnosti retenčních časů jednotlivých píků standardu GRO. Na Obrázku 23 je přes sebe přeloženo 15 jednotlivých nástřiků standardu GRO změřených bez předkolony. Obrázek 24 představuje 14 nástřiků standardu GRO změřených za stejných podmínek, ale s použitím předkolony, ve všech případech byla rychlost nástřiku 800 $\mu\text{l}/\text{min}$. Z jednotlivých retenčních časů uhlovodíků C6, C7, C8, C9 a C10 všech provedených nástřiků byla stanovena relativní směrodatná odchylka, a to zvláště pro experimenty bez předkolony a s předkolonou.



Obrázek 23: Opakovatelnost retence uhlovodíků C6 a C7, teplotní program je uveden v Tabulce 13, měřeno bez použití předkolony a s rychlosti nástřiku 800 $\mu\text{l}/\text{min}$ (15 nástřiků).



Obrázek 24: Opakovatelnost retence uhlovodíků C6 a C7, teplotní program je uveden v Tabulce 13, měřeno s použitím předkolony a s rychlosti nástřiku 800 $\mu\text{l}/\text{min}$ (14 nástřiků).

Porovnáním hodnot relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé retenční časy *n*-alkanů C6–C10 lze usoudit, že aplikace předkolony má pozitivní vliv na opakovatelnost retenčních časů, a to především na u retenčních časů uhlovodíků C6 a C7. Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 9 a 10.

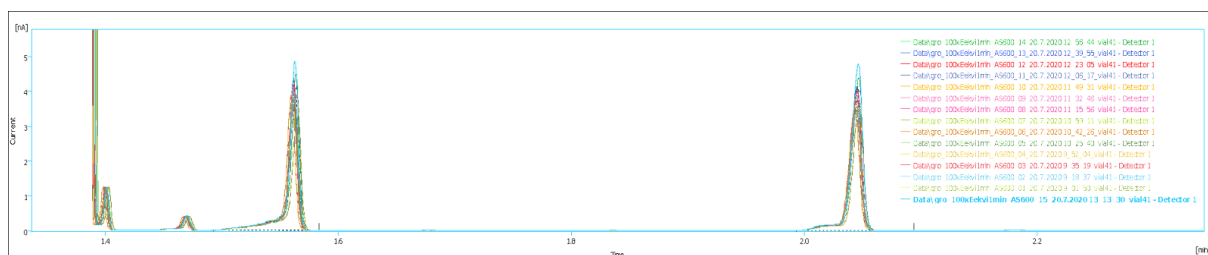
Tabulka 9: Retenční časy *n*-alkanů C6–C10, 15 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, bez předkolony, rychlost nástřiku 800 µl/min.

	Retenční čas [min]				
	C6	C7	C8	C9	C10
1	1,246	1,742	2,474	3,183	3,809
2	1,245	1,742	2,475	3,183	3,809
3	1,238	1,737	2,473	3,183	3,809
4	1,234	1,734	2,472	3,183	3,809
5	1,227	1,728	2,469	3,182	3,809
6	1,226	1,728	2,469	3,182	3,810
7	1,228	1,730	2,469	3,182	3,808
8	1,228	1,730	2,470	3,182	3,809
9	1,236	1,735	2,473	3,183	3,808
10	1,240	1,739	2,473	3,183	3,809
11	1,237	1,736	2,473	3,183	3,808
12	1,236	1,736	2,473	3,183	3,808
13	1,245	1,743	2,476	3,183	3,808
14	1,240	1,739	2,474	3,183	3,809
15	1,242	1,740	2,475	3,184	3,810
Průměr [min]	1,237	1,736	2,473	3,183	3,809
SD [min]	0,0068	0,0051	0,0023	0,0006	0,0007
RSD [%]	0,55	0,29	0,09	0,02	0,02

Tabulka 10: Retenční časy *n*-alkanů C6–C10, 14 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, s předkolonou (5 m × 0,32 mm), rychlost nástřiku 800 µl/min.

	Retenční čas [min]				
	C6	C7	C8	C9	C10
1	1,528	2,016	2,688	3,354	3,957
2	1,526	2,015	2,688	3,355	3,958
3	1,535	2,022	2,690	3,356	3,958
4	1,532	2,019	2,690	3,356	3,958
5	1,533	2,020	2,690	3,355	3,958
6	1,540	2,025	2,692	3,357	3,958
7	1,532	2,019	2,689	3,356	3,958
8	1,534	2,021	2,690	3,356	3,958
9	1,532	2,020	2,690	3,356	3,958
10	1,533	2,020	2,690	3,356	3,958
11	1,535	2,022	2,691	3,357	3,958
12	1,533	2,021	2,691	3,357	3,959
13	1,533	2,020	2,690	3,356	3,958
14	1,535	2,022	2,692	3,357	3,959
Průměr [min]	1,533	2,020	2,690	3,356	3,958
SD [min]	0,00327	0,00251	0,00121	0,00088	0,00048
RSD [%]	0,21	0,12	0,04	0,03	0,01

Obrázky 25 a 26 zobrazují 15 měření při rychlosti nástřiku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 15 měření při rychlosti nástřiku 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$. Všechny retenční časy byly opět zaznamenány a jsou uvedeny v Tabulkách 11 a 12. Opět byly porovnány výsledné relativní směrodatné odchylky retenčních časů jednotlivých *n*-alkanů C6–C10. Z výsledků se potvrdilo, že kombinace aplikace předkolony a pomalejšího nástřiku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ poskytuje výbornou opakovatelnost retenčních časů a je to proto výsledné nastavení validované metody.

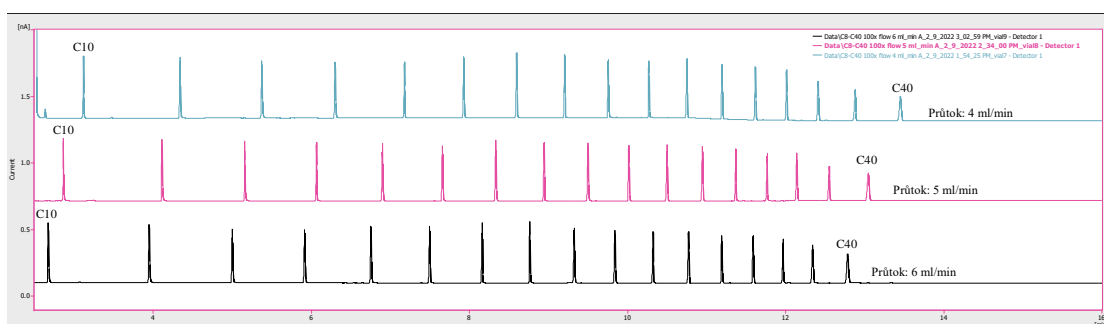


Obrázek 25: Opakovatelnost retence uhlovodíků C6 a C7, teplotní program je uveden v Tabulce 13. měřeno s použitím předkolony a s rychlostí nástřiku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ (15 nástřiků).



Obrázek 26: Opakovatelnost retence uhlovodíků C6 a C7, teplotní program je uveden v Tabulce 13, měřeno s použitím předkolony; rychlost nástřiku 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$ (15 nástřiků).

Vliv hodnoty průtoku mobilní fáze kolonou na retenci a dělení *n*-alkanů v měřeném standardu je vidět na Obrázku 27, všechny tři testované hodnoty průtoku mobilní fáze kolonou poskytují dostačující rozdělení pro vyvíjenou metodu diplomové práce.



Obrázek 27: Chromatogram sudých *n*-alkanů C10–C40 zobrazující 3 různé rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou (4 ml/min, 5 ml/min, 6 ml/min).

Tabulka 11: Retenční časy *n*-alkanů C6–C10, 14 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, s předkolumnou, rychlost nástřiku 1000 µl/min.

	Retenční čas [min]				
	C6	C7	C8	C9	C10
1	1,548	2,033	2,697	3,360	3,960
2	1,546	2,032	2,697	3,359	3,960
3	1,544	2,031	2,695	3,359	3,959
4	1,553	2,036	2,698	3,359	3,960
5	1,559	2,041	2,701	3,361	3,960
6	1,564	2,045	2,703	3,362	3,961
7	1,566	2,046	2,704	3,363	3,962
8	1,566	2,047	2,705	3,363	3,962
9	1,566	2,046	2,704	3,363	3,962
10	1,566	2,046	2,705	3,363	3,962
11	1,566	2,047	2,705	3,363	3,962
12	1,565	2,046	2,704	3,363	3,962
13	1,564	2,045	2,705	3,364	3,963
14	1,564	2,047	2,708	3,368	3,967
Průměr [min]	1,560	2,042	2,702	3,362	3,962
SD [min]	0,00831	0,00618	0,00393	0,00245	0,00195
RSD [%]	0,53	0,30	0,15	0,07	0,05

Tabulka 12: Retenční časy *n*-alkanů C6–C10, 15 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, s předkolumnou, rychlost nástřiku 600 µl/min.

	Retenční čas [min]				
	C6	C7	C8	C9	C10
1	1,562	2,045	2,703	3,362	3,961
2	1,563	2,046	2,704	3,362	3,962
3	1,562	2,045	2,703	3,362	3,962
4	1,564	2,047	2,704	3,362	3,962
5	1,565	2,047	2,705	3,363	3,962
6	1,560	2,043	2,703	3,362	3,962
7	1,561	2,044	2,703	3,362	3,962
8	1,561	2,044	2,703	3,362	3,962
9	1,562	2,045	2,703	3,362	3,962
10	1,562	2,045	2,703	3,362	3,962
11	1,562	2,045	2,704	3,363	3,962
12	1,563	2,046	2,704	3,363	3,963
13	1,562	2,046	2,705	3,364	3,962
14	1,563	2,047	2,705	3,364	3,963
15	1,563	2,047	2,706	3,364	3,963
Průměr [min]	1,562	2,045	2,704	3,363	3,962
SD [min]	0,00123	0,00125	0,00099	0,00083	0,00052
RSD [%]	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01

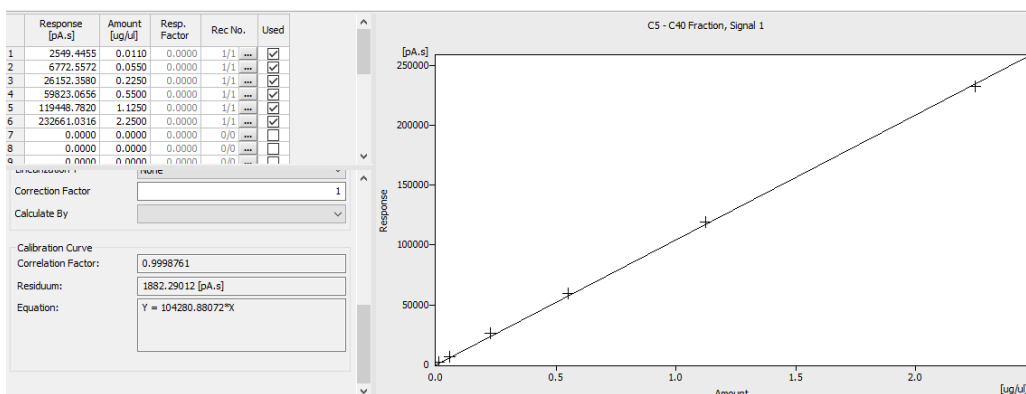
Výsledná měřicí metoda je optimalizovaná, aby odpovídala požadavkům metody – dostatečně vysoká odezva, dobré rozdělení především předních analytů, rychlost metody. Na základě výsledků v této kapitole (5.5) byla nastavena finální instrumentální metoda, její parametry jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Parametry nastavení GC.

Teplota nástřiku	Track oven
Objem nástřiku	5 μ l
Metoda nástřiku	On-column
Dávkovací rychlost	600 μ l/min
Teplotní program	celkový čas 17 min, rozmezí teplot 33-350 °C
Kolona	ZB -5 (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μ m)
Nosný plyn	vodík
Teplota detektoru	350 °C
Průtok vzduchu	350 ml/min
Průtok dusíku Makeup flow	25 ml/min
Mód	Constant Flow
Průtok	6 ml/min

5.6 Linearita a pracovní rozsah metody

Bylo zjištěno, že metoda vykazuje lineární závislost v rozsahu koncentrací měřených roztoků 0,011 mg/ml – 2,25 mg/ml s korelačním faktorem $>0,999$. Rozsah metody byl validován v koncentračních mezích 0,011 mg/ml – 2,25 mg/ml v celkové frakci $>C5-C40$. Rozsah koncentrací měřených roztoků odpovídá rozsahu koncentrací 5,5 mg/kg – 1125 mg/kg ve vzorku zeminy. V případě koncentrací analytů ve vzorcích vyšších, než je horní mez koncentračního rozmezí by bylo nutno vzorky vhodně ředit. Na Obrázku 28 je uveden příklad kalibrační křivky zkonstruovaný ve vyhodnocovacím programu Clarity, včetně výsledného korelačního faktoru, který má hodnotu 0,99987.



Obrázek 28: Kalibrační křivka v programu Clarity.

5.7 LOD, LOQ a limit reportování metody

Požadované limity reportování vycházejí z legislativních požadavků, které se v různých zemích mohou lišit. V České republice jsou v legislativě uvedeny je limitní hodnoty pro parametr TPH (C10-C40). Limit reportování i vypočítané limity LOD a LOQ jsou uvedeny v Tabulce 14. Vypočítané hodnoty LOD i LOQ jsou u všech stanovovaných frakcí menší než požadovaný limit reportování, jedná se proto o vyhovující výsledek.

Tabulka 14: Vypočítané LOD, LOQ. Spočítáno z výsledků deseti slepých stanovení.

Stanovovaná frakce	LOD	LOQ	Požadovaný limit reportování	Legislativa
	[mg/kg] ve vzorku	[mg/kg] ve vzorku	[mg/kg/DW] ve vzorku	Země
>C5–C6 Alifatická frakce	0,13	0,41836	1	Turecko*
C6–C7 Alifatická frakce	0,08	0,27146	1	Turecko*
C7–C8 Alifatická frakce	0,01	0,03965	1	Turecko*
C8–C9 Alifatická frakce	0,08	0,28089	1	N/A
C9–C10 Alifatická frakce	0,08	0,28018	1	N/A
C10–C12 Alifatická frakce	0,09	0,30391	5	N/A
C12–C16 Alifatická frakce	0,07	0,23487	10	N/A

Stanovovaná frakce	LOD	LOQ	Požadovaný limit reportování	Legislativa
	[mg/kg] ve vzorku	[mg/kg] ve vzorku	[mg/kg/DW] ve vzorku	Země
C16–C21 Alifatická frakce	0,11	0,37	10	N/A
C21–C30 Alifatická frakce	0,25	0,84	10	N/A
C30–C35 Alifatická frakce	0,09	0,29	10	N/A
C35–C40 Alifatická frakce	0,36	1,21	5	N/A
>C5–C40 Alifatická frakce	0,54	1,79	55	N/A
>C6–C7 Aromatická frakce	0,08	0,27	1	N/A
C7–C8 Aromatická frakce	0,13	0,44	1	N/A
C8–C9 Aromatická frakce	0,07	0,22	1	N/A
C9–C10 Aromatická frakce	0,13	0,43	1	N/A
C10–C12 Aromatická frakce	0,10	0,34	5	Švédsko*
C12–C16 Aromatická frakce	0,18	0,62	10	Švédsko*
C16–C21 Aromatická frakce	0,15	0,48	10	Švédsko*
C21–C30 Aromatická frakce	0,08	0,26	10	Švédsko*
C30–C35 Aromatická frakce	0,06	0,20	10	Švédsko*
C35–C40 Aromatická frakce	0,21	0,69	5	N/A
>C6–C40 Aromatická frakce	0,41	1,35	55	N/A
>C5–C6	0,13	0,42	1	N/A
C6–C7	0,11	0,38	1	N/A
C7–C8	0,13	0,45	1	N/A
C8–C9	0,13	0,43	1	N/A
C9–C10	0,13	0,44	1	N/A
C10–C12	0,13	0,44	5	N/A
C12–C16	0,19	0,62	10	Polsko*
C16–C21	0,13	0,43	10	Polsko*
C21–C30	0,26	0,85	10	Polsko*
C30–C35	0,08	0,27	10	Polsko*
C35–C40	0,44	1,45	5	N/A
>C5–C40	0,74	2,46	55	N/A

*V posledním sloupci Tabulky 14 jsou uvedeny země, pro které jsou sledovány vybrané parametry a jejichž limit vychází z následujících dokumentů:

- Polsko: Ministerstvo životního prostředí Polské republiky. 2016. Nařízení Ministerstva životního prostředí o způsobu hodnocení znečištění zemského povrchu. Varšava. Položka 1395.
- Turecko: Dokument Ministerstva životního prostředí, urbanizace a změny klimatu Turecké republiky. 2009. Posouzení rizika kontaminovaných míst – technický průvodce. Ankara.
- Švédsko: Švédská agentura pro ochranu životního prostředí. 2016. Všeobecné směrné hodnoty pro kontaminovanou půdu. Stockholm.

V Tabulce 15 jsou uvedeny vypočítané LOD a LOQ hodnoty získané z výsledků experimentů na koncentračních hladinách 20,5 mg/kg pro frakci aromatických uhlovodíků >C6–C40 a 27,5 mg/kg pro frakci alifatických uhlovodíků >C5–C40. Vypočítané hodnoty LOQ jsou nižší než hodnoty požadovaných limitů reportování, výsledky jsou tedy vyhovující.

Tabulka 15: Vypočítané LOD a LOQ. Spočítáno z výsledků deseti experimentů na hladině ½ požadovaného limitu reportování pro dané frakce.

Stanovovaná frakce	LOD	LOQ	Požadovaný limit reportování
	[mg/kg] ve vzorku	[mg/kg] ve vzorku	[mg/kg/DW] ve vzorku
>C5–C40 Alifatická frakce	9,0	30,0	55
>C6–C40 Aromatická frakce	6,9	23,0	55

5.8 Pravdivost, preciznost

Tabulky 16-21 zobrazují výsledky experimentů na vybraných koncentračních hladinách, vypočítané relativní směrodatné odchylky, výtěžnosti a v případě známé referenční hodnoty stanovované frakce je uvedena vždy i hodnota pravdivosti. Všechny výsledky jsou vyhovující, výtěžnost všech ověřovaných parametrů na různých koncentračních hladinách se pohybuje v rozmezí 70,6–124,9 %.

Tabulka 16: Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka pro experimenty na koncentrační hladině 1000 mg/kg stanovovaných látek.

Stanovovaná frakce	Průměr (n=12) [mg/kg] ve vzorku	Relativní směrodatná odchylka [%]	Pravdivost [%]	Referenční hodnota [mg/kg] ve vzorku
>C5–C40 Alifatická frakce	826,8	6,67	-	-
>C6–C40 Aromatická frakce	236,6	11,11	-	-
>C5–C40	1063,3	4,51	106,3	1000

Tabulka 17: Výsledky jednotlivých experimentů na koncentrační hladině 1000 mg/kg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
>C5–C40 Alifatická frakce [mg/kg]	759	890	898	805	876	871	805	863	716	821	802	814
>C6–C40 Aromatická frakce [mg/kg]	267	250	209	278	205	210	212	215	235	236	265	257
>C5–C40 [mg/kg]	1026	1140	1107	1083	1081	1081	1017	1078	951	1057	1067	1071
Výtěžnost [%]	102,6	114,0	110,7	108,3	108,1	108,1	101,7	107,8	95,1	105,7	106,7	107,1

Tabulka 18: Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka pro experimenty na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek.

Stanovovaná frakce	Průměr	Relativní směrodatná odchylka	Pravdivost	Referenční hodnota
	[mg/kg] ve vzorku	[%]	[%]	[mg/kg] ve vzorku
>C5–C40 Alifatická frakce	97,1	11,80	88,3	110,0
>C6–C40 Aromatická frakce	78,6	6,80	98,2	80,0
>C5–C40	175,7	7,38	92,5	190,0

Tabulka 19: Výsledky jednotlivých experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
>C5–C40 Alifatická frakce [mg/kg]	116	106	85	101	109	89	96	80	88	101
Výtěžnost [%]	105,4	96,7	77,7	91,7	98,6	80,6	87,4	73,1	79,8	91,6
>C6–C40 Aromatická frakce [mg/kg]	76	77	82	83	74	72	83	73	78	88
Výtěžnost [%]	94,6	96,3	102,6	104,2	92,3	89,5	104,3	91,0	97,8	109,7
>C5–C40 [mg/kg]	192	183	168	184	182	160	180	153	166	189
Výtěžnost [%]	100,9	96,5	88,2	97,0	96,0	84,3	94,5	80,6	87,4	99,2

Tabulka 20: Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka pro experimenty na koncentrační hladině 48 mg/kg stanovovaných látek.

Stanovovaná frakce	Průměr	Relativní směrodatná odchylka	Pravdivost	Referenční hodnota
	[mg/kg] ve vzorku	[%]	[%]	[mg/kg] ve vzorku
>C5–C40 Alifatická frakce	24,8	13,97	90,1	27,5
>C6–C40 Aromatická frakce	22,2	11,08	108,4	20,5
>C5–C40	47,0	10,30	97,9	48,0

Tabulka 21: Výsledky jednotlivých experimentů na koncentrační hladině 48 mg/kg stanovovaných látek.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
>C5–C40 Alifatická frakce [mg/kg]	25,1	29,4	28,7	28,9	22,8	20,5	19,4	22,8	24,9	25,4
Výtěžnost [%]	91,1	106,8	104,2	105,0	82,9	74,6	70,6	82,9	90,6	92,5
>C6–C40 Aromatická frakce [mg/kg]	25,0	24,3	21,2	25,6	22,7	20,9	23,3	18,5	22,0	18,6
Výtěžnost [%]	122,0	118,7	103,5	124,9	110,6	102,0	113,7	90,3	107,1	90,8
>C5–C40 [mg/kg]	50,1	53,7	49,9	54,5	45,5	41,4	42,7	41,3	46,9	44,0
Výtěžnost [%]	104,3	111,9	103,9	113,5	94,7	86,3	89,0	86,1	97,6	91,7

5.9 Reprodukovatelnost metody

V Tabulkách 22 a 23 jsou porovnány výsledky experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg ropných uhlovodíků >C5-C40 připravené dvěma různými laboranty. Byly vypočítány i hodnoty výtěžnosti, pravdivosti a RSD. Výsledky všech parametrů jsou vyhovující a poukazují na dobrou reprodukovatelnost metody.

Tabulka 22: Výsledky experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek připravených dvěma různými pracovníky.

	Laborant 1					Laborant 2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
>C5–C40 Alifatická frakce [mg/kg]	124,8	123,9	125,2	102,9	98,9	125,3	98,2	115,4	117,8	101,5
Výtěžnost [%]	113,5	112,7	113,8	93,6	89,9	114,0	89,3	104,9	107,1	92,3
>C6–C40 Aromatická frakce [mg/kg]	98,3	94,9	95,2	97,0	79,9	93,0	82,9	80,9	83,7	94,0
Výtěžnost [%]	122,8	118,7	119,0	121,2	99,9	116,3	103,7	101,1	104,6	117,5
>C5–C40 [mg/kg]	223,1	218,9	220,4	199,9	178,8	218,4	181,2	196,2	201,5	195,6
Výtěžnost [%]	117,4	115,2	116,0	105,2	94,1	114,9	95,3	103,3	106,0	102,9

Tabulka 23: Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek připravených dvěma různými pracovníky.

Stanovovaná frakce	Průměr	Relativní směrodatná odchylka	Pravdivost	Referenční hodnota
	[mg/kg] ve vzorku	[%]	[%]	[mg/kg] ve vzorku
>C5–C40 Alifatická frakce	113,4	10,35	103,1	110,0
>C6–C40 Aromatická frakce	90,0	8,02	112,5	80,0
>C5–C40	203,4	7,97	107,0	190,0

5.10 Nejistota metody

V tabulce 24 jsou uvedeny hodnoty nejistoty odhadnuté přístupem „top-down“ a rozšířené nejistoty. Hodnoty nejistoty byly vypočítány ze všech výsledků naměřených z validačních experimentů, pro které byla známá referenční koncentrační hladina. Pro získání rozšířené nejistoty byl použit koeficient rozšíření 2 (faktor 1,96 je rozšíření pro pokrytí 95 % výsledků).

Tabulka 24: Výsledky rozšířené nejistoty metody spočítané pomocí ANOVA

	Nejistota ANOVA [%]	Rozšířená nejistota [%]	Průměrná výtěžnost [%]	Průměrná RSD [%]
>C5–C40 Alifatická frakce	1,50	3,01	89,2	12,9
>C6–C40 Aromatická frakce	5,05	10,09	103,3	9,00
>C5–C40	4,89	9,78	98,9	7,60

5.11 Analýza certifikovaného referenčního materiálu

V Tabulce 25 jsou uvedeny výsledky analýzy (připraveného) certifikovaného referenčního materiálu, k němuž je přiložen list parametrů a informací od výrobce – Příloha 4.

Tabulka 25: Výsledky dvakrát analyzovaného (připraveného) certifikovaného referenčního materiálu (TPH – Sand 1, Sigma-Aldrich)

Parametr	Referenční hodnota koncentrace [mg/kg]	CRM 1 [mg/kg]	CRM 1 Shoda v rámci nejistoty metody (30 %)	CRM 2 [mg/kg]	CRM 2 Shoda v rámci nejistoty metody (30 %)
>C8–C10 Alifatická frakce	5,68 ± 0,36	4,10 ± 1,23	ANO	4,80 ± 1,44	ANO
C10–C12 Alifatická frakce	23,9 ± 2,8	32,0 ± 9,6	ANO	28,6 ± 8,6	ANO
C9–C18 Alifatická frakce	96,5 ± 13,3	116 ± 35	ANO	105 ± 32	ANO
>C12–C16 Alifatická frakce	74,7 ± 4,7	80,7 ± 24,2	ANO	72,9 ± 21,9	ANO
>C16–C21 Alifatická frakce	60,9 ± 3,9	39,9 ± 12,0	NE	36,1 ± 10,8	NE
>C21–C34 Alifatická frakce	9,78 ± 0,62	10,2 ± 3,1	ANO	7,30 ± 2,19	ANO
C19–C36 Alifatická frakce	37,1 ± 10,1	18,5 ± 5,6	NE	16,5 ± 5,0	NE
>C8–C10 Aromatická frakce	1,36 ± 0,17	2,00 ± 0,60	ANO	2,00 ± 0,60	ANO
C10–C12 Aromatická frakce	13,6 ± 0,9	11,3 ± 3,4	ANO	12,9 ± 3,9	ANO
>C12–C16 Aromatická frakce	45,0 ± 2,9	49,9 ± 15,0	ANO	62,3 ± 18,7	ANO
>C16–C21 Aromatická frakce	55,7 ± 3,5	34,0 ± 10,2	NE	35,7 ± 10,7	NE
>C21–C34 Aromatická frakce	8,98 ± 0,57	7,90 ± 2,37	ANO	8,00 ± 2,40	ANO
C11–C22 Aromatická frakce	104 ± 14	90,5 ± 27,2	ANO	111 ± 33	ANO

6 Diskuze

6.1 Selektivita a rušivé vlivy

Jak bylo uvedeno již v kapitole 3.4.1 FID detektor není selektivní, a proto kontaminace nežádoucími látkami během přípravy může ovlivnit výslednou analýzu.

Možné příčiny interferencí mohou být následující:

- kontaminace rozpouštědel
- kontaminace laboratorního skla
- přítomnost koextrahovatelných látek v plastových pomůckách

Aby se zamezilo možné kontaminace musí být dodržována pravidla uvedená níže.

Eliminace interferencí:

- Používaný *n*-pentan pro extrakci vzorků musí mít nejvyšší čistotu a vždy musí být testována každá nová šarže přípravou několika slepých stanovení MB.
- Snaha o zamezení použití jakýchkoliv plastových pomůcek, jelikož jsou z plastu po kontaktu s rozpouštědly *n*-pentanem a zejména dichlormethanem uvolňovány kontaminující látky.
- Opatrné převádění extraktu do měřicích vialek, aby bylo zamezeno kontaktu ochranných latexových rukavic s extraktem, jsou z nich také uvolňovány kontaminující látky.
- Vialka s extraktem je měřena na GC-FID opětovně pouze pokud bylo vyměněno teflonové víčko. Při opakovaném nástřiku způsobuje již propíchnuté víčko kontaminaci extraktu.
- Před každým měřením na GC jsou vyměněny oplachové vialky, pro oplach je používán aceton a *n*-pentan (3 oplachové vialky od každého), dávkovací stříkačka je vždy promyta nejprve acetonem a poté *n*-pentanem (nastaveno automaticky v software Clarity).
- Používané laboratorní sklo je po použití umyto automatickým programem v myčce a následně propláchnuto nejprve dichlormethanem a poté *n*-pentanem.

6.2 Příprava dělicí kolonky

Jedním z nejdůležitějších kroků v této diplomové práci byl návrh kolonek pro rozdělení získaného extraktu na alifatickou a aromatickou frakci. Bylo ověřováno správné rozdělení stanovovaných analytů pomocí standardů alifatických uhlovodíků, PAU a BTEX. Správné rozdělení BTEX od alifatické frakce je kritickým krokem, jelikož se tyto látky často přecházejí do alifatické frakce, a to z důvodu nižší afinity k silikagelu. Pokud kolonka správně dělí BTEX a alifatické uhlovodíky, lze předpokládat, že bude dostatečně účinná i pro separaci PAU od alifatické frakce. PAU mají díky svým vlastnostem vyšší afinitu k silikagelu než BTEX.

Při optimalizaci finálního postupu a výběru frakcionační kolonky byly zohledňovány následující faktory:

- Robustnost – menší odchylky v přípravě kolonek nesmí mít zásadní vliv na konečný výsledek. Je třeba zohlednit, že v běžném laboratorním provozu musí postup zvládnout několik laborantů.
- Jednoduchá příprava, praktičnost – laboratorní personál musí být schopen zpracovat např. i několik desítek vzorků za den.
- Cena – výsledná cena kolonky nesmí příliš navýšit celkovou cenu analýzy
- Správnost – kolonka musí být funkční a správně rozdělit stanovované analyty, s důrazem především na separaci těkavých aromatických látek BTEX
- Dostatečná kapacita – kolonka by měla dělit aromatickou a alifatickou frakci uhlovodíků i při vyšších koncentracích, které můžeme nacházet v reálných vzorcích. V případě nedostatečné kapacity kolonky, by bylo nutné vysoce kontaminované vzorky reanalyzovat, čímž by docházelo k navyšování nákladů na provoz metody.

Po několika sériích experimentů a testování byla jako nejvhodnější varianta pro dělicí krok vybrána skleněná kolonka s nálevkou a fritou (kapitola 4.5.2). Pro stanovení správného elučního objemu *n*-pentanu pro alifatickou frakci a dichlormethanu pro aromatickou frakci, bylo nutné experimentálně určit eluční profil alifatických i aromatických uhlovodíků nanesených na tuto kolonu. Během experimentů pro stanovení elučního profilu kolonky bylo pro eluci aromatické frakce použito 10 ml dichlormethanu, což bylo prokázáno jako dostačující (viz kapitola 5.3). U reálných vzorků, kde mohou být vysoké koncentrace aromatických látek je vhodné pro eluci aromatické frakce použít 15 ml dichlormethanu, aby bylo jisté, že dojde k vymytí všech aromatických látek i při jejich vyšších koncentracích ve vzorku.

Navržené skleněné kolonky poskytovaly dobré výsledky dělení aromatických i alifatických frakcí. Je nutné poznamenat, že výsledný eluční objem stanovený pro alifatickou frakci, nelze použít pro jiné kolonky bez předchozího testování, neboť i menší odchylka v průměru kolonky nebo množství použitého silikagelu může elučním objemem významně ovlivnit. Při plnění kolonek je také nutné dávat pozor na narušení silikagelového sloupce a v případě viditelných bublin či prasklin kolonku naplnit znovu. Vadně naplněnou kolonku můžeme vidět v Příloze 1. Při testování byly kolonky vždy nasyceny rozpouštědlem (*n*-pentan či dichlormethan) a hladina rozpouštědla byla minimálně 1 cm nad vrstvou silikagelu. Přebytečné rozpouštědlo bylo odpouštěno až těsně před nanesením extraktu na kolonku. Malá vrstva bezvodého síranu sodného na povrchu silikagelu chrání kolonku před vyschnutím díky schopnosti síranu sodného vázat na sebe vzdušnou vlhkost. Pro zaručení co nejlepších výsledků je vhodné nanést na připravené kolonky po vypuštění rozpouštědla extrakt do pěti minut, jako tomu bylo během testování. Pokud se zpracovává vyšší množství vzorků, je vhodné, aby byly zpracovány v sériích maximálně deseti vzorků najednou.

6.3 Optimalizace technických parametrů dělicí kolonky

V průběhu vývoje metody byly vytipovány úpravy, které by mohly zefektivnit a zjednodušit přípravu silikagelových kolonek. Původní skleněné kolonky s nálevkou měly fritu, to se nejprve jevílo jako plus, protože nebylo nutné kolonky plnit ucpávkou. S postupem

času bylo vysledováno, že přibližně jednu z deseti naplněných kolonek je nutné znovu připravit z důvodu narušení silikagelové vrstvy bublinou vzduch uvolněnou z frity. Přebytečný vzduch z frity se odstraňoval před plněním kolonek poklepáním, to bohužel nebylo vždy dostatečně účinné. V několika případech se bublina vzduchu uvolnila až za několik minut a tím se poškodil sloupec silikagelu již naplněné kolonky. Jako další varianta byly tedy zvoleny kolonky bez frity, do kterých se jako ucpávka používá malý chomáček skelné vaty, tím se tento problém vyřešil. Další menší změna proběhla zkrácením celkové délky kolonky. Původní kolonky měly délku cca 30 cm, ale sloupec naplněný 2 g silikagelu byl vysoký jen přibližně 6 cm. Kolonky byly tedy zkráceny na délku 15 cm, což výrazně usnadňuje nanášení extraktu na kolonku. Byla testována také varianta stejné kolonky bez nálevky, avšak u této kolonky bylo prokazatelně horší její plnění. Tato varianta byla tedy vyloučena. V Příloze 3 jsou vedle sebe pro ukázkou zobrazeny výše uvedené testované varianty kolonek. Ani jedna z úprav uvedených v této kapitole neměla vliv na eluční profil kolonky, ale výrazně ovlivnila praktičnost jejich použití v rutinní praxi.

6.4 Komerční silikagelové kolonky

Manuální příprava kolonek s sebou nese riziko v jejich variabilitě ovlivněné aktuálním provedením a představuje časovou zátěž pro laboratorní personál. Z tohoto důvodu byly testovány i komerčně dostupné kolonky, které představovaly časově nejméně náročnou variantu, avšak za cenu vyšších nákladů. Na trhu se vyskytuje poměrně velké množství produktů pro dělení alifatických a aromatických frakcí ropných uhlovodíků. Jejich využití má mnoho předností, mezi ty hlavní se řadí úspora času, robustnost, spolehlivost a lepší opakovatelnost dělicího kroku. V rámci této práce bylo otestováno 5 různých typů kolonek od několika výrobců, kolonky jsou zobrazeny na Obrázku 29. Testovány byly tyto kolonky:

- Skleněná kolonka (Chromabond), objem 6 ml, 2 g silikagelu,
- Plastová kolonka (Chromabond), objem 6 ml, 2 g silikagelu
- Plastová kolonka pro frakcionaci extrahovatelných ropných uhlovodíků (EPH Fractionation SPE) objem 6 ml, 2 g silikagelu
- Plastová kolonka (Bond Elut TPH), objem 6 ml, 2 g silikagelu
- Teflonová kolonka (Strata EPH), objem 6 ml, 2,5 g silikagelu

Výsledky slepých stanovení kolonek prokázaly výskyt nežádoucí kontaminace, uvolňující se z výrobního materiálu kolonek i přes dodržení výrobcem doporučeného postupu. Ze všech výše uvedených kolonek byla kontaminace nejnižší u EPH frakcionační kolonky od výrobce Restek. Výsledná koncentrace kontaminujících látek v měřeném extraktu však nebyla konstantní a byla ovlivněna přípravou a především dobou, po kterou byla kolonka vystavena kontaktu s dichlormethanem. Pro požadované limity reportování metody nebyla vhodná ani jedna z těchto kolonek.

Skleněná kolonka Chromabond byla jako jediná z testovaných komerčních kolonek vyrobená ze skla a neuvolňovaly se z ní žádné kontaminující látky. Bohužel po kondicionaci kolonky bylo viditelné, že obsahuje spoustu bublinek a narušení sloupce silikagelu, která zásadně ovlivňovaly dělicí krok – Obrázek 30.



Obrázek 29: Všechny testované komerční kolonky, zleva – skleněná kolonka chromabond, plastová kolonka Chromabond, EPH frakcionační kolonka Restek, plastová kolonka Bond Elut, teflonová kolonka Strata EPH.



Obrázek 30: Komerční skleněná silikagelová kolonka Chromabond po kondicionaci, z obrázku je viditelné narušení silikagelového sloupce.

6.5 Zpracování vysoce kontaminovaných vzorků

Přestože byl dělicí krok testován na maximální koncentraci aromatických látek 80 mg/kg ve vzorku, částečně byl ověřen i pro koncentrace vyšší. Pro experimenty na koncentrační hladině 1000 mg/kg všech stanovovaných látek byl použit čistý standard lubrikačního oleje a nafty (1:1). Bohužel není známé přesné složení – obsah aromatických a alifatických uhlovodíků v tomto standardu, proto lze ověřit výtěžnost těchto experimentů jen pro celkovou frakci všech uhlovodíků >C5–C40. Na základě výsledků aromatické frakce, získané z dvanácti opakování experimentu, kde výsledná relativní směrodatná odchylka je 11,11 % lze předpokládat, že dělicí krok je účinný i pro koncentrace aromatických látek ve vzorku kolem 240 mg/kg – hodnota průměrné koncentrace aromatické frakce >C6-C40 získaná z dvanácti opakování. V případě vysoce kontaminovaných vzorků, které přesahují v aromatické frakci hodnotu nejvyššího kalibračního bodu (odpovídá koncentraci ropných uhlovodíků 1125 mg/kg ve vzorku při standardním postupu) a je tedy potřeba je ředit. Vždy je třeba brát v potaz i chromatografický profil změřených extraktů alifatické i aromatické frakce. Na základě chromatografického profilu může být odhaleno chybné rozdělení a to především, pokud se nacházejí v extraktu alifatické frakce i aromatické frakce píky se stejným retenčním časem. Vysoký obsah PAU ve vzorku může být indikován zbarvením extraktu před nanesením na kolonku – typická je svítivě žlutá barva extraktu – Příloha 2. Pokud má laborant připravující vzorky dostatek zkušeností, může se rozhodnout takto zbarvený extrakt také naředit před dělicím krokem. V extrémních případech, kdy je kontaminace opravdu vysoká (>10000 mg/kg) je vhodné vzorky znovu připravit z nižší navážky a kombinovat přípravu z menšího množství s naředěním extraktu před dělicím krokem.

6.6 Výsledná měřicí metoda

Z důvodu stanovení vysoce těkavých látek počínaje látkami s retenčním časem za *n*-pentanem (bod varu 36,1 °C) byl kladen důraz na to, aby měřicí instrumentální metoda dosahovala dostatečného rozdělení předních analytů a vysoké opakovatelnosti retenčních časů při zachování relativně krátkého měřicího času výsledné metody. Bylo sledováno několik faktorů, jako například vliv průtoku kolonou na analýzu.

Vzhledem k tomu, že vyvíjená analytická metoda této diplomové práce má být používána v komerční laboratoři s velkým průtokem vzorků, byl kladen důraz i na parametry, které neovlivňují pouze přesnost analýzy jako takové, ale ovlivňují např. možnost „automatizace“ vyhodnocování. Jako příklad lze uvést optimalizaci podmínek nástřiku, jejíž cílem bylo zlepšit opakovatelnost retenčních časů převážně předních *n*-alkanů (C6–C10), které slouží jako markery k určení intervalu pro vyhodnocování jednotlivých frakcí. Výsledky RSD retenčních časů při všech testovaných nastaveních dosahovaly vyhovujících hodnot a aplikací předkolony a změnou rychlosti nástřiku došlo k relativně malému zlepšení, které však může být v praxi významné. V rámci optimalizace analytické metody jsou využívány nástroje a makra, pomocí kterých lze celý proces urychlit a zautomatizovat. Co nejlepší opakovatelnost retenčních časů umožňuje, aby byly tyto nástroje co nejefektivněji využívány.

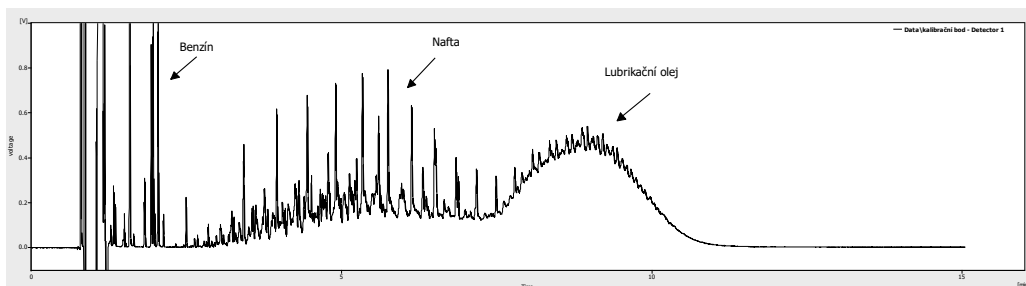
Vyšší průtok mobilní fáze kolonou vede k rychlejší eluci látek, ale může vést k horší separaci. Jelikož cílem diplomové práce nebyla kvantifikace samostatných píků,

ale vybraných časových úseků chromatogramu ohraničených retenčními markery (*n*-alkany C6–C40) nebylo prioritou dosáhnout co nejlepšího rozlišení sledovaných *n*-alkanů. Při volbě průtoku mobilní fáze bylo přihlédnuto k požadavkům na rychlost analýzy, dostačující selektivitu a intenzitu odezvy. Z Obrázku 27 je patrné, že všechny tři testované průtoky poskytují dostatečnou separaci *n*-alkanů. Rozdíly v intenzitě odezvy jsou ve všech případech minimální, a proto byl zvolen pro výslednou metodu průtok mobilní fáze kolonou 6 ml/min.

Výsledná měřicí metoda je rychlá, s dobrým rozdělením předních frakcí a vysokou opakovatelností retenčních časů *n*-alkanů. Tím, že je používán on-column nástřik a na kolonu je nastřikován objem vzorku 5 μ l, musí být prováděna rutinní údržba stroje před každým měřením. Mezi rutinní údržbu patří zkracování kolony či předkolony a čištění jehly i pístu dávkovací stříkačky. Teplotní program instrumentální metody dosahuje nejvyšší teploty 350 °C, což je maximální teplotní limit použití kolony (uvedeno výrobcem). Nejvíce problematické jsou vzorky obsahující vysokovroucí látky (bod varu vyšší 500 °C) s retenčním časem vyšším než retenční čas C40. Tyto látky zůstávají v koloně a při vysoké koncentraci kolonu nenávratně poškodí. Mezi takto problematické látky patří například asfalt, u kterého lze díky velmi tmavému zabarvení extraktu předejít poškození kolony tím, že je extrakt naředěn před měřením na GC-FID. Aby se předešlo paměťovému efektu, kdy vzorek kontaminuje další vzorky za ním, je za každými třemi extrakty vzorků měřen čistý *n*-pentan (ten může být použit ve vyhodnocovacím software k odečtení pozadí).

6.7 Kvalitativní analýza

Výsledná analytická metoda je potenciálně vhodná i pro kvalitativní zhodnocení obsahu uhlovodíků. Aby bylo možné určit typ kontaminace, je nutné mít změřené dostatečné množství standardů, z jejichž chromatografických profilů lze vytvořit knihovnu, ve které je vyhledávána shoda mezi vzorkem a standardem. Standardy musí být změřeny za stejných podmínek jako vzorky (Tabulka 13). Technika GC/FID však neumožňuje přesnou identifikaci látek ve vzorku, jako např. technika GC-MS. Chromatografické profily ropných produktů jako je nafta, topné oleje nebo benzín mohou být rozpoznány s velmi vysokou pravděpodobností. Na Obrázku 31 je zobrazen chromatogram 4. kalibračního bodu obsahujícího 3 typy ropných produktů – bezolovnatý benzín, naftu a lubrikační olej.



Obrázek 31: Chromatogram 4. kalibračního bodu.

6.8 Validační charakteristiky

Všechny testované validační charakteristiky měly vyhovující výsledky. Hodnota relativní směrodatné odchylky dosahovala u všech provedených sérií experimentů hodnoty <12 %. U experimentů na hladině 1000 mg/kg pro celkovou frakci uhlovodíků >C5–C40 byl navažován standard nafty a oleje, z důvodu velmi malé navážky 20 mg a vysoké hustoty standardu, bylo velmi těžké navážit přesně 20 mg. Navážky standardu nafty a oleje se pohybovaly v rozmezí 19,2–22 mg, jedná se tedy o velmi dobrý výsledek. Rozšířená nejistota metody dosahovala u všech tří testovaných frakcí výsledku <11 %. U komerčních laboratoří bývá uváděna pro analýzy ropných uhlovodíků nejistota metody 30 %. V této nejistotě musí být zahrnuty všechny kroky navážení vzorků až po konečné vyhodnocení změřeného extraktu. U vyvíjené metody diplomové práce byly všechny kroky od navážky vzorků, žíhání silikagelu, extrakce, přípravu standardů, kalibrace stroje až po finální vyhodnocení prováděny jednou osobou. Tomu odpovídá dobrý výsledek nejistoty metody. V reálném provozu komerční laboratoře, kde je zpracováváno vysoké množství vzorků jsou jednotlivé kroky odděleny a prováděny na různých stanovištích, je proto dobré, aby nastavená hodnota nejistoty metody byla vyšší než hodnota, která byla vypočítána z výsledků validace. U metody diplomové práce byla nastavena finální nejistota metody na 30 %.

6.8.1 Robustnost

Robustnost metody nebyla testována statisticky, avšak během vývoje metody byly definovány kritické kroky, které musí být důsledně monitorovány. Nejkritičtějším krokem analýzy je příprava vzorků, je nutné, aby vzorkovnice před jejich mechanickým třepáním byly dokonale uzavřeny, aby bylo zabráněno odpaření části *n*-pentanu a tím k ovlivnění výsledků. Protože je *n*-pentan velmi těkavý (teplota varu 36,1 °C) musí se dbát na to, aby byl extrakt uzavřený po celou dobu přípravy – po odebrání extraktu je zkumavka s extraktem ihned uzavřena, stejný proces je nutné dodržet v případě měřicí vialky. Finální extrakty, měřené na GC-FID je nezbytné skladovat v mrazicím boxu (teplota -20 °C a méně). Při zakoncentrování vzorků proudem dusíku na finální objem musí být nastaven slabý průtok dusíku. Krok zakoncentrování je kritický, při příliš vysokém proudu dusíku může dojít ke ztrátě těkavých analytů s nízkým retenčním časem. Separáčnı́ účinnost každé várky silikagelu musí být před použitím otestována, ideálně na směsném standardu alifatických i aromatických látek. Pokud je silikagel vyhovující (alifatické i aromatické látky se správně rozdělily), silikagel musí být uložen v exsikátoru. Během práce se silikagelem je potřeba dbát na zamezení jeho vystavení vzdušné vlhkosti – ihned po odsypání je vrácen do exsikátoru. V případě nevhodného skladování, nebo delšího vystavení vzdušné vlhkosti se na silikagel sorbuje voda a tím je významně snížena jeho schopnost vázat aromatické látky, čímž jsou ovlivněny výsledky celé analýzy.

6.8.2 LOD, LOQ a limit reportování

Výsledky získané ze slepých stanovení dosahují mnohem nižšího LOQ než je limit reportování požadovaný legislativou. Bylo tedy prokázáno, že vyvinutá metoda je dostatečně citlivá pro kontrolu těchto požadavků.

6.9 Analýza certifikovaného referenčního materiálu

Pro ověření přesnosti metody byl také použit certifikovaný referenční materiál - CRM, jehož list je přiložen jako Příloha 4. Byly ověřeny frakce, které lze stanovit nově vyvinutou metodou a zároveň pro ně byly známé referenční hodnoty. Porovnáme-li výsledky získané analýzou připraveného CRM a referenční hodnoty uvedené v listu certifikátu, výsledky měření připraveného certifikovaného materiálu se shodují s referenčními hodnotami v rámci nejistoty metody (30 %) u většiny parametrů. Jako problematické se ukázaly frakce >C16–C21 Alifatická frakce, C19–C36 Alifatická frakce a >C16–C21 Aromatická frakce. Výsledky těchto frakcí však vyhovují navrhovanému akceptovatelnému rozmezí výsledků uvedeném na certifikátu výrobcem. Všechny ověřované frakce a jejich výsledky jsou uvedeny v Tabulce 25. Jako indikátor přesnosti metody mohou kromě výsledků CRM sloužit i výsledky experimentů na hladině 1000 mg/kg, a to proto, že byl použit standard čisté neředitelné látky, na rozdíl od referenčního materiálu zde byl kontrolován každý krok včetně navážky standardu a vzorky zemin byly po obohacení na požadovanou koncentrační hladinu ihned zpracovány. Dalším plánovaným krokem je účast na MPZ (mezilaboratorní porovnávací zkoušky), což kvůli časové náročnosti nebylo možné dokončit v rámci diplomové práce.

6.10 Surrogate standard

Pro kontrolu účinnosti extrakce a separace jednotlivých frakcí lze využít tzv. „surrogate standard“. Je tedy vhodné, aby obsahoval analyty ze skupiny jak alifatických, tak i aromatických látek. Vhodné alternativy jsou například: 2-Fluorobifenyl a *o*-Terpenyl ze skupiny aromatických uhlovodíků a 5- α -Androstan či 1-Chloroktadekan ze skupiny alifatických uhlovodíků. Během optimalizace metody nebyl surrogate standard využit, jelikož byly vždy známé referenční hladiny stanovovaných analytů. U reálných vzorků však bude sloužit výtěžnost surrogate standardu jako indikátor přesnosti celé přípravy a může odhalit hrubé chyby v postupu. U všech čtyř testovaných standardů došlo k eluci ve správné frakci, jako další faktor se zohledňoval retenční čas jednotlivých standardů. Jako lepší varianta byly zvoleny standardy 2-Fluorbifenyly ze skupiny aromatických uhlovodíků a 5- α -Androstanu ze skupiny alifatických uhlovodíků. Retenční časy 2-Fluorbifenyly a 5- α -Androstanu jsou dostatečně daleko od sebe a nižší retenční čas 2-Fluorbifenyly lépe odráží správný průběh dělicího kroku u kterého je kritické rozdělení aromatických látek s nízkým retenčním časem, především BTEX a PAU s menším počtem benzenových jader.

6.11 Reprodukovatelnost

Z důvodu časové náročnosti byla reprodukovatelnost ověřena v rámci stejné laboratoře, kde byla validována metoda diplomové práce. Výsledky experimentů připravených dvěma různými pracovníky byly ve velmi dobré shodě. Na stejnou koncentrační hladinu stanovovaných látek byly obohaceny i reálné matrice vzorků při testování preciznosti a pravdivosti (Kapitola 4.9.3). Celkem je možné porovnat 20 opakování na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek ve vzorku provedených v různé dny různými pracovníky. Výsledky všech opakování ($n=20$) se shodují v rámci nejistoty metody (30 %) s referenční hodnotou koncentrace všech tří ověřovaných frakcí.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce byl vývoj a validace analytické metody pro stanovení ropných uhlovodíků v zeminách (celkových extrahovatelných semi-volatilních, alifatických a aromatických frakcí ropných uhlovodíků) a separace této velké skupiny látek na blíže specifikované frakce. Nově vyvinutá metoda je určena pro stanovení látek s retenčním časem uhlovodíků >C₅, čímž je umožněno paralelní stanovení volatilní uhlovodíkové frakce. V rámci experimentální části byly optimalizovány jednotlivé kroky analytického postupu; zejména pak krok separace aromatické a alifatické frakce a také podmínky nástřiku a měření na GC/FID (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem).

Výsledná analytická metoda dosahuje velmi dobrých výsledků pro všechny testované validační charakteristiky. Byla potvrzena původní hypotéza, že metodu lze použít jako rychlou screeningovou metodu, která poskytne velké množství informací o analyzovaném vzorku v podobě zastoupení jednotlivých uhlovodíkových frakcí i celkového množství ropných uhlovodíků (parametr TPH). Optimalizovaný postup je vhodný i pro rutinní laboratoře, které zpracovávají několik desítek vzorků denně, a to jak z pohledu průchodu vzorku laboratoří, tak z pohledu ekonomického. Nevýhodou je, že analýzou pomocí techniky GC-FID nelze určit přesné kvalitativní složení všech kontaminujících látek. Pro lepší interpretaci výsledků dle zamýšleného účelu lze při pozitivním nálezu v aromatických frakcích zvážit následnou analýzu vzorku také metodami vyvinutými přímo pro stanovení PAU – nejčastěji tedy pomocí GC-MS nebo HPLC-FLD.

8 Seznam tabulek

Č. 1	Nepříznivý efekt kontaminované půdy naftou na růst a vývoj různých druhů rostlin	7
Č. 2	Akutní toxické účinky nafty na člověka dle typu expozice	8
Č. 3	Přehled maximálních povolených hodnot indikátorů znečištění zemin a podzemní vody ropnými látkami dle MŽP	12
Č. 4	Porovnání několika vybraných charakteristik u metod zabývajících se stanovením ropných uhlovodíků	22
Č. 5	Příklad kalibračních roztoků	27
Č. 6	Navážky a výsledné koncentrace jednotlivých <i>n</i> -alkanů v pracovním roztoku.... (směs devíti alifatických uhlovodíků).....	28
Č. 7	Příprava koncentrační hladiny odpovídající přibližně ½ požadovaného limitu reportování celkové alifatické a aromatické frakci obohacením praného mořského písku	36
Č. 8	Příprava hladiny 190 mg/kg celkové alifatické a aromatické frakce >C5–C40 obohacením vzorků reálných matric	38
Č. 9	Retenční časy <i>n</i> -alkanů C6–C10, 15 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, bez předkolony, rychlost nástřiku 800 µl/min	46
Č. 10	Retenční časy <i>n</i> -alkanů C6–C10, 14 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, s předkolonou (5 m × 0,32 mm), rychlost nástřiku 800 µl/min.....	46
Č. 11	Retenční časy <i>n</i> -alkanů C6–C10, 14 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, s předkolonou, rychlost nástřiku 1000 µl/min	48
Č. 12	Retenční časy <i>n</i> -alkanů C6–C10, 15 nástřiků standardu GRO. Podmínky měřicí metody: průtok 6 ml/min, s předkolonou, rychlost nástřiku 600 µl/min	48
Č. 13	Parametry nastavení GC	49
Č. 14	Vypočítané LOD, LOQ. Spočítáno z výsledků deseti slepých stanovení.....	50,51
Č. 15	Vypočítané LOD a LOQ. Spočítáno z výsledků deseti experimentů na hladině ½ požadovaného limitu reportování	52
Č. 16	Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka pro experimenty na koncentrační hladině 1000 mg/kg stanovovaných látek	53
Č. 17	Výsledky jednotlivých experimentů na koncentrační hladině 1000 mg/kg.....	53

Č. 18	Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka pro experimenty na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek	53
Č. 19	Výsledky jednotlivých experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek.....	54
Č. 20	Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka pro experimenty na koncentrační hladině 48 mg/kg stanovovaných látek	54
Č. 21	Výsledky jednotlivých experimentů na koncentrační hladině 48 mg/kg.....	54
Č. 22	Výsledky experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek připravených dvěma různými pracovníky	55
Č. 23	Vypočítaná pravdivost a relativní směrodatná odchylka experimentů na koncentrační hladině 190 mg/kg stanovovaných látek připravených dvěma různými pracovníky	55
Č. 24	Výsledky rozšířené nejistoty metody spočítané pomocí ANOVA	56
Č. 25	Výsledky dvakrát analyzovaného (připraveného) certifikovaného referenčního materiálu (TPH – Sand 1, Sigma-Aldrich)	56

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

- ASTM – American Society for Testing and Materials (Americká Společnost pro Testování a Materiály)
- BTEX – benzen, toluen, ethylbenzen, xylen
- CRM – certifikovaný referenční materiál
- ČSN – česká technická norma
- DW – sušina, suchá hmotnost (dry weight)
- EN – evropská norma
- EPA – Agentura pro Ochranu Životního Prostředí (Environmental Protection Agency)
- EPH – extrahovatelné ropné uhlovodíky (extractable petroleum hydrocarbons)
- FID – plamenový ionizační detektor (flame ionization detector)
- GC – plynová chromatografie (gas chromatography)
- HHRA – Human Health Risk Assessment (hodnocení rizik pro lidského zdraví)
- IRZ – Integrovaný registr znečišťování životního prostředí
- ISO – Mezinárodní Organizace pro Standardizace (International Organization for Standardization)
- LOQ – limit kvantifikace (limit of quantification)
- LOD – limit detekce (limit of detection)
- MPZ – mezilaboratorní porovnávací zkoušky
- MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
- MŽP – Ministerstvo životního prostředí
- NEL – nepolární extrahovatelné látky
- PAU – polycyklické aromatické uhlovodíky (polycyclic aromatic hydrocarbon)
- PCB – polychlorované bifenyly
- RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
- RU – ropné uhlovodíky
- SPE – extrakce pevnou fází fází (solid phase extraction)
- TN – technická norma
- TNRCC – Texaská Komise pro Ochranu Přírodních Zdrojů (Texas Natural Resource Conservation Comision)
- TS – technická specifikace (technical specification)
- TPH – veškeré ropné uhlovodíky (total petroleum hydrocarbons)
- ÚNMZ – Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví

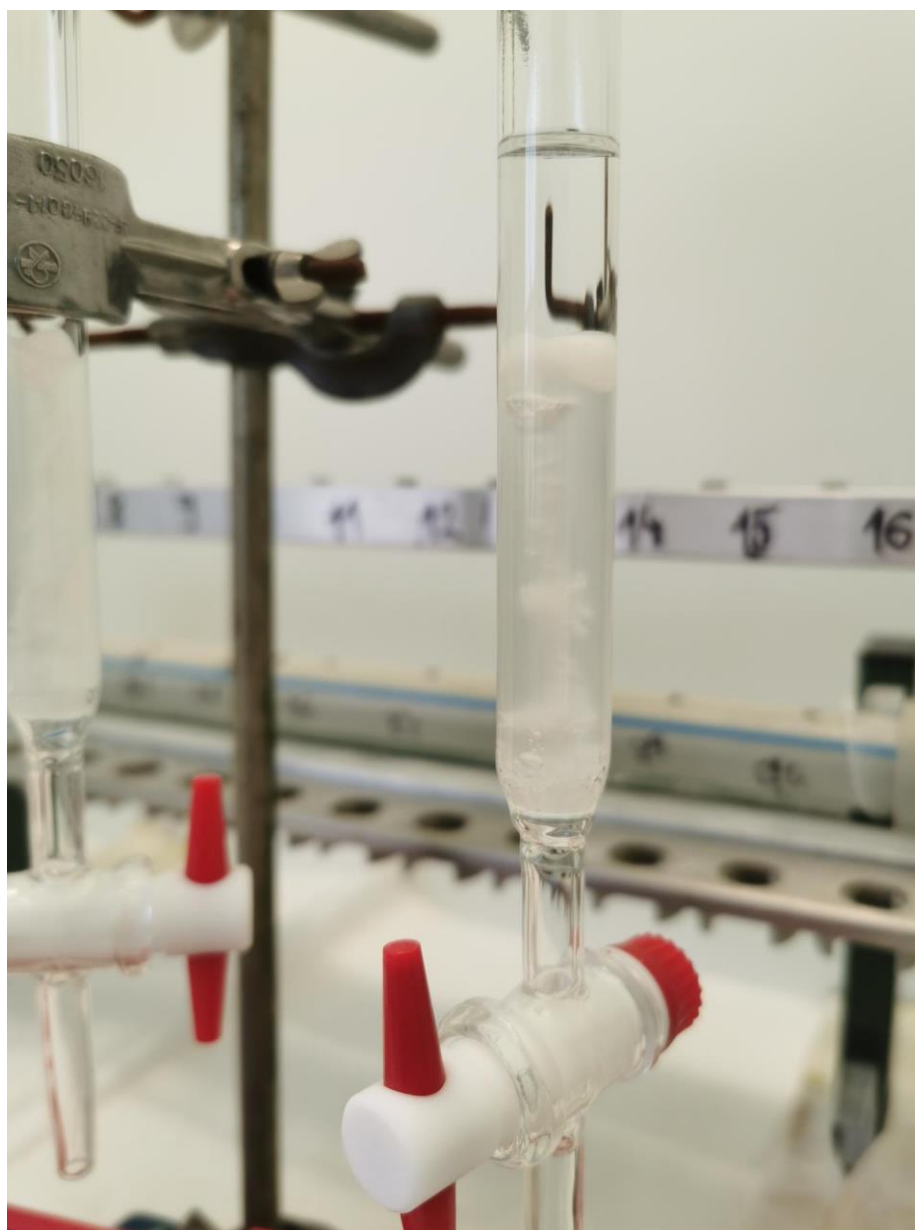
10 Literatura

- Adeniji AO, Okoh OO, Okoh AI. 2018. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons and their global trend of distribution in water and sediment: a review. In Zoveidavianpoor M, editor. *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*. IntechOpen, London. DOI: 10.5772/intechopen.71163.
- Adeniji AO, Okoh OO, Okoh AI. 2017. Analytical methods for the determination of the distribution of total petroleum hydrocarbons in the water and sediment of aquatic systems: a review. *Journal of Chemistry* (e5178937). DOI: 10.1155/2017/5178937.
- Blažek J, Rábl V. 2006. *Základy Zpracování a Využití Ropy*. VŠCHT, Praha.
- Cortes JE, Suspes A, Roa S, Gonzalez C, Castro HE. 2012. Total petroleum hydrocarbons by gas chromatography in Colombian waters and soils. *American Journal of Environmental Sciences* **8**:396-402. DOI: 10.3844/ajessp.2012.396.402.
- Cruz JM, Tamada IS, Lopes PRM, Montagnolli RN, Bidoia ED. 2014. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water, Air, & Soil Pollution* **225** (e1962). DOI: 10.1007/s11270-014-1962-5.
- ČSN EN ISO 9000. 2016. *Systémy managementu kvality - Základní principy a slovník*. Český normalizační institut, Praha.
- Dobbeleer I, Galbiati F, Teli L. 2016. Determination of total petroleum hydrocarbons in rubble and soils by accelerated solvent extraction and GC-FID. Thermo Fisher Scientific, Poster Note 64829.
- Dong MW. 2019. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*, second edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Fowzia A, Fakhruddin ANM. 2018. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* **11** (e555811). DOI: 10.19080/IJESNR.2018.11.555811.
- Grob R, Barry E. 2004. *Modern Practice of Gas Chromatography – fourth edition*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Haider FU, Ejaz M, Cheema SA, Khan MI, Zhao B, Liqun C, Salim MA, Naveed M, Khan N, Núñez-Delgado A, Mustafa A. 2021. Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. *Environmental Research* **197** (e111031). DOI: 10.1016/j.envres.2021.111031.
- Hall S, Tang R, Baeyens J, Dewil R. 2009. Removing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons From Water By Adsorption On Silicagel. *Polycyclic Aromatic Compounds* **29(3)**:160-183. DOI:10.1080/10406630903017534.
- Howard PH. 1989 *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals: Volume I: Large Production and Priority Pollutants*. Lewis Publishers, Michigan.

- Ismail S, Abu SA, Rezaur R, Sinin H. 2014. Biodiesel Production from Castor Oil and Its Application in Diesel Engine. *Journal on Science and Technology for Development* **31(2)**:90-100. DOI:10.29037/ajstd.18.
- Khan MAI, Biswas B, Smith E, Naidu R, Megharaj M. 2018. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil: *Chemosphere* **212**:755-767.
- Mansouri E, Yousefi V, Ebrahimi V, Eyvazi S, Hejazi MS, Mahdavi M, Mesbahi A, Tarhriz V. 2020. Overview of ultraviolet-based methods used in polycyclic aromatic hydrocarbons analysis and measurement. *Separation Science Plus* DOI: 10.1002/sscp.201900077.
- Ministerstvo životního prostředí České republiky. Metodický pokyn odboru pro ekologické škody Ministerstva životního prostředí České republiky – kritéria znečištění zemin a podzemní vody. 1996. čl. 3, příloha 1.
- Ossai IC, Aziz A, Auwalu H, Fauziah SH. 2020. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation* **17** (e100526). DOI: 10.1016/j.eti.2019.100526.
- Pinedo J, Ibáñez R, Lijzen JPA, Irabien A. 2014. Human Risk Assessment of Contaminated Soils by Oil Products: Total TPH Content Versus Fraction Approach. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **20**:1231-1248.
- Podehradská J, Vozňáková Z. 1997. Návod pro laboratorní cvičení z Analytické chemie II. Plynová chromatografie. VŠCHT, Praha.
- Rauckyte T, Žak S, Pawlak Z, Oloyede A. 2010. Determination of oil and grease, total petroleum hydrocarbons and volatile aromatic compounds in soil and sediment samples. *Journal of environmental engineering and landscape management* **18(3)**:163-169.
- Ravichandran V, Shalini S, Sundram KM, Harish R. 2010. Validation of analytical methods – strategies and importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2(3)**:18-22.
- Simpson NJK, Wells MJM. 2000. *Solid-phase Extraction: Principles, Techniques, And Applications*. Taylor & Francis Group LLC, Harbor City.
- Száková J, Tlustoš P. 2019. *Kontaminace Prostředí a Remediacce*. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Telepchak MJ, August TF, Chaney G. 2004. *Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- TNI 01 0115. 2009. *Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)*.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1999. *Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH)*. Atlanta, Georgia.

- Villegas M, Sommarin M, Brodelius PE. 2000. Effects of sodium orthovanadate on benzophenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**:233–241.
- Wang L, Cheng Y, Lamb D, Naidu R. 2020. The application of rapid handheld FTIR petroleum hydrocarbon- contaminant measurement with transport models for site assessment: A case study: *Geoderma* **361** (e114017). DOI: 10.1016/j.geoderma.2019.114017.
- Wang Z, Fingas M, Page DS. 1999. Oil spill identification. *Journal of Chromatography A* **843**:369-411. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00120-X.
- Xie W, Li R, Li X, Liu P, Yang H, Wu T, Zhang Y. 2018. Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **161**:763-768. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.053.
- Ye Y, Ding Y, Jiang Q, Wang F, Sun J, Zhu C. 2017. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports* **36**:235–242.
- Zrafi I, Hizem L, Chalghmi H, Ghrabi A, Rouabhia M, Saidane-Mosbahi D. 2013. Aliphatic and aromatic biomarkers for petroleum hydrocarbon investigation in marine sediment. *Journal of Petroleum Science Research* **2**:145–155.

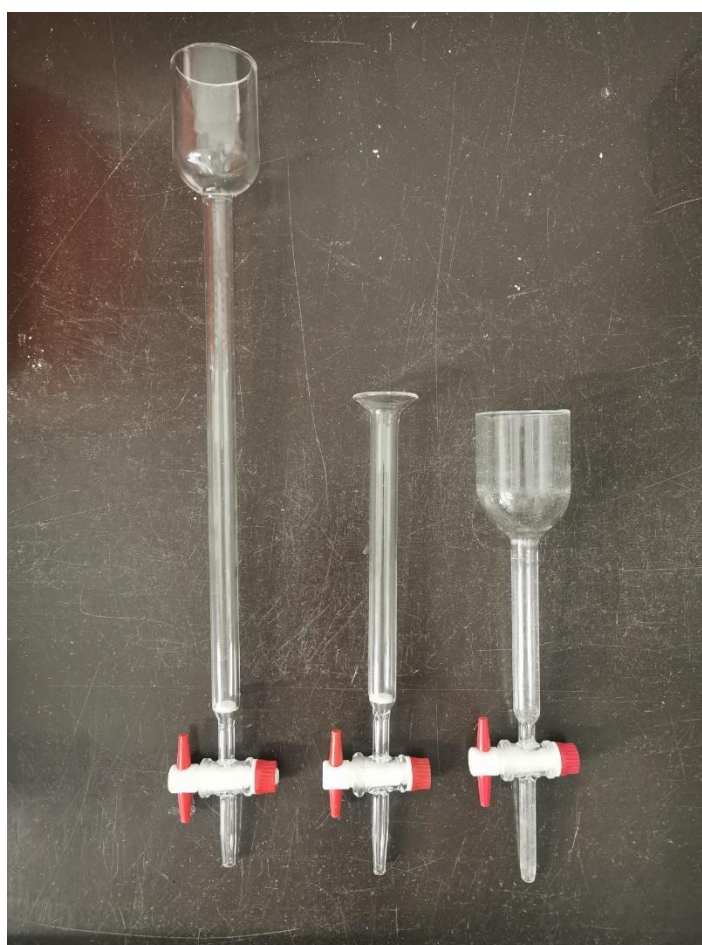
11 Samostatné přílohy



Příloha 1: Naplněná kolonka s narušeným sloupcem silikagelu.



Příloha 2: Roztok mix PAU o koncentraci 0,1 mg/ml nanesený na malé skleněné kolonce, lze pozorovat svítivě žluté zbarvení typické pro PAU.



Příloha 3: Testované varianty skleněných kolonek. Zvolená varianta je zkrácená kolonka bez frity s nálevkou (3. zleva).

Certificate of Analysis

TPH - Sand 1

*Certified
Reference
Material*

Description

Product ID CRM372-100G
Lot LRAC8921
Expiration Date January 2024
Manufacturing Date January 2021
Storage Conditions ROOM TEMPERATURE
Solvent/Matrix Sand

Certified Values

Analyte	Units	Certified Value ^{1,4}
C10-C12 Aliphatic Hydrocarbons	mg/Kg	23.9 ± 2.8
C10-C12 Aromatics Hydrocarbons	mg/Kg	13.6 ± 0.9
C9-C18 Aliphatic Hydrocarbons	mg/Kg	96.5 ± 13.3
Diesel Range Organics (by OA-2)	mg/Kg	457 ± 19
Diesel Range Organics (DRO)	mg/Kg	329 ± 26
Diesel Range Organics, C10-C20 (California LUFT)	mg/kg	457 ± 19
Diesel range organics, C10-C28	mg/Kg	304 ± 25
EPH Aliphatic >C12-C16	mg/Kg	74.7 ± 4.7
EPH Aliphatic >C16-C21	mg/Kg	60.9 ± 3.9
EPH Aliphatic >C21-C34	mg/Kg	9.78 ± 0.62
EPH Aliphatic C19-C36	mg/Kg	37.1 ± 10.1
EPH Aromatic >C12-C16	mg/Kg	45 ± 2.9
EPH Aromatic >C16-C21	mg/Kg	55.7 ± 3.5
EPH Aromatic >C21-C34	mg/Kg	8.98 ± 0.57
EPH Aromatic C11-C22	mg/Kg	104 ± 14
Total EPH	mg/Kg	336 ± 15
Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)	mg/kg	457 ± 19
VPH Aliphatic >C8-C10	mg/Kg	5.68 ± 0.36
VPH Aromatic >C8-C10	mg/Kg	1.36 ± 0.17

Informational Values

Analyte	Units	Suggested Acceptance Windows	Standard Deviation
C10-C12 Aliphatic Hydrocarbons	mg/Kg	5.29 to 42.6	9.33
C10-C12 Aromatics Hydrocarbons	mg/Kg	5.00 to 22.2	2.86
C9-C18 Aliphatic Hydrocarbons	mg/Kg	0.00 to 229	44.2
Diesel Range Organics (by OA-2)	mg/Kg	274 to 640	60.9



SIGMA-ALDRICH

2931 Soldier Springs Rd. Laramie, Wyoming 82070 USA
800-325-6832
TechService@milliporesigma.com www.sigma-aldrich.com

Description

Lot **LRAC8921**
Expiration Date January 2024
Manufacturing Date January 2021
Storage Conditions ROOM TEMPERATURE
Solvent/Matrix Sand

Diesel Range Organics (DRO)	mg/Kg	71.1 to 588	86.1
Diesel Range Organics, C10-C20 (California LUFT)	mg/kg	274 to 640	60.9
Diesel range organics, C10-C28	mg/Kg	59.4 to 549	81.5
EPH Aliphatic >C12-C16	mg/Kg	27.5 to 122	15.7
EPH Aliphatic >C16-C21	mg/Kg	22.4 to 99.4	12.8
EPH Aliphatic >C21-C34	mg/Kg	3.60 to 16.0	2.06
EPH Aliphatic C19-C36	mg/Kg	0.00 to 138	33.5
EPH Aromatic >C12-C16	mg/Kg	16.6 to 73.5	9.48
EPH Aromatic >C16-C21	mg/Kg	20.5 to 90.8	11.7
EPH Aromatic >C21-C34	mg/Kg	3.31 to 14.6	1.89
EPH Aromatic C11-C22	mg/Kg	0.00 to 241	45.6
Total EPH	mg/Kg	185 to 487	50.4
Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)	mg/kg	274 to 640	60.9
VPH Aliphatic >C8-C10	mg/Kg	2.09 to 9.27	1.20
VPH Aromatic >C8-C10	mg/Kg	0.68 to 2.04	0.227

Additional Information:

Description

The sample is a soil containing total petroleum hydrocarbons (TPH).
The sample size provided is 100 g of soil.
The soil has been sterilized to minimize degradation of the sample.
The sample has been sized to 100 mesh.
The sample has been intentionally prepared with an apparent headspace.

Storage

The sample should be stored at room temperature. It has been determined to be stable for the duration of the expiration date. After sub-sampling replace cap securely and store remaining sample at 4°C.
The shelf life of the product was determined by historic stability of similar CRM's. The expiration date may be extended based on stock and popularity upon successful stability testing by a 17025 accredited laboratory. Stability and shelf life after opening must be determined by the user, taking into account sampling frequency/volume and all local conditions.

Preparation Instructions

The soil is to be extracted and analyzed using an appropriate extraction and analytical method for TPH, assuming a high concentration sample. The values given are based on GC-FID/PID and column separation methods for aliphatics and aromatics.
Mix well. No particle size reduction is necessary. Do Not allow the sample to warm to room temperature prior to sub-sampling. Recommended minimum sampling size is 10g. The sample has been determined to be homogeneous to 1g.
Scope and Application

The TPH in Soil Certified Reference Material (CRM) consists of a single amber glass sample jar, with a Teflon lined closure containing approximately 100 grams of soil, fortified with No. 2 Diesel and 30WT motor oil. Being a natural matrix waste sample the analyst is challenged by the same preparation problems, analytical interferences, etc. as is typical for similar



Certificate of Analysis

TPH - Sand 1

Certified
Reference
Material

Description

Product ID CRM372-100G
Lot LRAC8921
Expiration Date January 2024
Manufacturing Date January 2021
Storage Conditions ROOM TEMPERATURE
Solvent/Matrix Sand

matrices received by the laboratory for analysis. Rigorous analyses identified, quantified, and certified various aliphatic and aromatic banding which are listed on the enclosed Certificate of Analysis. The sample has been analyzed by a minimum of 12 independent laboratories in a round-robin to meet the requirements specified by the ISO 17034 and ISO 17025.

1 Metrological traceability: Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/-0.0001 g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.
4 Ucm - Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (Ucm) corresponding to the 95% confidence interval. Ucm is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. K=2 unless specified. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies. The mathematical representation of the Ucm calculation is as follows:

$$U_{CRM} = k \sqrt{U_{char}^2 + U_{homogeneity}^2 + U_{stability}^2}$$

k: Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. Assume 2.0 for a Confidence Interval = 95%

Traceability: The standard was manufactured under an ISO/IEC 17025:2017 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/- 0.0001g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

Homogeneity: Homogeneity was assessed in accordance with ISO 17034:2016. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared using a one-way analysis of variance approach as described by TNI EL-V3-2009 Appendix A.2. See instructions for minimum sub-sample size.

Expiration is at end of month given on certificate and label.

MSDS reports for components comprising greater than 1.0% of the solution or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.

THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2017 (ANAB Cert AT-1487) and ISO 17034:2016 (ANAB Cert AR-1470).

Andy Ommen - QC Manager

Mark Pooler - QA Supervisor

Certification Date February 08, 2021
Version 0-282021



SIGMA-ALDRICH
2931 Soldier Springs Rd. Laramie, Wyoming 82070 USA
800-325-5832
TechService@milliporesigma.com www.sigma-aldrich.com

Příloha 4: List od výrobce uvádějící certifikované hodnoty koncentrací stanovovaných analytů pro CRM používané k ověření pravdivosti metody.